UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

SABRINI NATALI DA SILVA ÁVILA

Produção de lipase por fermentação no estado sólido e aplicação em biocatálise utilizando um único reator de leito fixo

RIO DE JANEIRO

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

SABRINI NATALI DA SILVA ÁVILA

Produção de lipase por fermentação no estado sólido e aplicação em biocatálise utilizando um único reator de leito fixo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadores: Profª. Drª. Denise Maria Guimarães Freire

Drª. Elisa d'Ávila Cavalcanti-Oliveira

RIO DE JANEIRO

2017

Produção de lipase por fermentação no estado sólido e aplicação em biocatálise utilizando um único reator de leito fixo

SABRINI NATALI DA SILVA ÁVILA

Orientadores: Profª. Drª. Denise Maria Guimarães Freire
Drª. Elisa d'Ávila Cavalcanti-Oliveira

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

_____
Presidente:
Profª. Drª. Denise Maria Guimarães Freire
Instituto de Química – UFRJ

_____
Profª Drª. Evelin Andrade Manoel
Faculdade de Famácia - UFRJ

_____
Drª. Aline Machado de Castro
Petrobras-BR

_____
Profª. Drª. Danielle Maria Perpétuo Oliveira Santos
Instituto de Química – UFRJ

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre agiu em minha vida e sem Ele nada seria possível.

À minha família: meus pais, Roberto e Mônica, que me deram amor acima de tudo, e que sempre fizeram o possível para que eu tivesse todas as oportunidades que não foram dadas a eles, sendo meus maiores exemplos de caráter e dignidade. E hoje eu só tenho que agradece-los por tudo o que sou. Amor maior não há; ao meu irmão, Hebert, que apesar daquelas coisas de irmão, sei o quanto torce pelas minhas conquistas e sei que será meu braço direito sempre que eu precisar, assim como serei dele; ao meu amor, melhor amigo e confidente, João Paulo, pessoa na qual foi descontado todo o meu mau humor, mas mesmo assim nunca deixou de estar do meu lado, de acreditar no meu potencial e me de amar (mesmo mau humorada! Rs). Ao seu lado tenho cada vez mais a certeza que fiz a escolha certa na minha vida. Minhas conquistas não são somente minhas, e sim nossas, pois sem seu amor e paciência nada seria possível. Te amo; à todos os meus familiares, que sempre torceram pela minhas conquistas, mesmo na distância. Em especial, minha prima-irmã Jaqueline, meus padrinhos Reliane e Valdivino, meu primo Everton, minha tia Miriam, minhas vózinhas Margarida e Maria, e meu avô Crisaldo. Amo todos vocês!

Às minhas orientadoras, Denise e Elisa: Denise, obrigada por todo voto de confiança e todos os ensinamentos compartilhados que foram fundamentais para a minha formação. Elisa, mais do que uma orientadora, uma mãe acadêmica. Mesmo tendo que se ausentar por um lindo motivo, sempre se fez presente, se colocando a disposição e se preocupando comigo. Não poderia escolher orientadora melhor. Muito obrigada!

À Professora Melissa, que foi minha orientadora na iniciação científica e sempre será a minha orientadora do coração, pois sempre se colocando a disposição para me ajudar. Sem ela eu não teria iniciado a minha vida acadêmica no LaBiM. Obrigada Mel!

À família LaBiM (Alô, alô!): Érika (capricorniana como eu, ou seja, somos sucesso!), Joab (irmão mais velho implicante que ganhei. Com poucas palavras consegue cativar as pessoas e não se deixa esquecer), Marcela (amiga de jornada e uma das melhores pessoas que conheci nos últimos anos. Que venha os próximos desafios e o carnaval), Graziela (Companheira! Trouxe um pouco de Itapetinga para o LaBiM e

nos ensinou que nada resiste ao trabalho), Maysa (Parceira de Xerém que só fui descobrir no LaBiM), Valéria (Compartilhou todo o seu conhecimento nos sistemas comigo e vai deixar muita saudade), Aline (Obrigada por toda a sua gestão, sempre fundamental), Maria Eduarda (A nossa integrante de humanas, com um coração enorme), Ana Carolina (sempre disposta a ajudar e se mostrando preocupada com o próximo), Carolina (Tão doce quanto seus doces, teve papel importante nessa jornada, sempre me dando conselhos e brownies), Jaqueline Nascimento, Jaqueline Greco, Priscila, Kássia, Keysson, Evelin, Mateus, Anderson. Não poderia escolher lugar melhor para trabalhar. Obrigada à todos por todo tipo de colaboração nesta jornada, por todo companheirismo e amizade, e por tornar nosso ambiente de trabalho descontraído e divertido. Vocês são os melhores!

À Priscila, por quem tenho um carinho muito especial, pois desde a iniciação cientifica vem me ajudando, compartilhando conhecimentos e caronas (rsrs). Foi uma das primeiras pessoas que me recebeu no laboratório, de braços abertos e sempre de bom humor. Pri você é muito importante para mim.

À Jaqueline Nascimento, que não vive sem me dar caronas (rsrs). Mas foram essas caronas que me ajudaram muito no desenvolvimento do meu trabalho e contribuíram também para o crescimento da nossa amizade. Obrigada Jaque, por toda orientação quando eu mais precisei, por todo conhecimento compartilhado, por todas as dicas e parcerias de trabalho. Isso tudo foi muito importante na minha formação. E você conquistou um lugarzinho especial no meu coração.

À todos os meus amigos que de alguma forma, longe ou perto, direta ou indiretamente, torceram por mim e colaboraram para a concretização de mais uma etapa na minha vida.

ÁVILA, Sabrini Natali da Silva. Produção de lipase por fermentação no estado sólido e aplicação em biocatálise utilizando um único reator de leito fixo. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017

Lipases constituem um grupo de enzimas capazes de catalisar a reação de hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis de cadeia média e longa, bem como reações de esterificação e de transesterificação. Estas enzimas comercialmente disponíveis apresentam um preço muito elevado e por isso a busca de novos biocatalisadores, obtidos por tecnologia de baixo custo, como a fermentação em estado sólido (FES), se faz necessária. A torta, subproduto da extração de óleos vegetais, pode ser utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de lipase por FES. O presente trabalho tem como objetivo realizar a produção de lipase por FES utilizando biorreator de leito fixo e em sequência, neste mesmo sistema, realizar reações de síntese (*one-pot*). O trabalho se divide em duas etapas: a primeira consiste em estudar a produção da lipase com capacidade de esterificação por FES em biorreator de leito fixo e, a segunda, realizar a reação de esterificação no mesmo biorreator, sem manipular o sólido fermentado contendo a lipase, tendo este como leito. A produção de lipases foi realizada empregando torta de babaçu como substrato e o fungo *Rhizomucor miehei* na FES, e a capacidade de síntese foi acompanhada por meio da reação padrão de esterificação em reator agitado, utilizando como biocatalisador a amostra fermentada seca. O melhor resultado foi obtido nas condições de fermentação de 35ºC, umidade inicial da torta de 65%, vazão de ar de 0,3 L/min e tempo de fermentação de 48h. Para a secagem da torta fermentada por meio da aeração forçada, foram selecionados a vazão de ar igual a 1,0 L/min e o tempo de secagem de 48h. A reação na coluna foi realizada com o sólido fermentado seco (*one-pot*), empregando como substratos ácido oleico e etanol, a 40ºC, com reciclo do meio reacional. Foi obtido 18,2 % de conversão em 6h de reação e 65,1% em 28h. Paralelamente à reação conduzida no sistema *one-pot* (biorreator de leito fixo), foram conduzidas duas reações controle empregando o mesmo meio reacional: uma em reator agitado e outra no reator de leito fixo com o biocatalisador fragmentado. O valor obtido em 6h de reação no sistema *one-pot* ficou abaixo do controle feito em reator agitado (71,4%), embora em 24h de reação o resultado tenha sido aproximado nos dois tipos de reatores (75,4%). Resultado do controle com o biocatalisador

fragmentado foi de 43,4% em 6h, porém, em 8h de reação foi obtido 63,3% de conversão, e 77,7% em 24h de reação. O pior desempenho da reação no sistema *one-pot* pode ter sido causado pela retração do leito fermentado durante a etapa de secagem, com conseqüente formação de caminho preferencial prejudicando a reação de esterificação. Para avaliar essa hipótese, foram conduzidas novas fermentações com fibra de polpa de dendê misturada à torta de babaçu com a finalidade de manter a estrutura do meio fermentado durante a etapa de secagem do material e diminuir a formação de caminhos preferencias da reação. Foi observado que a mistura contendo 40% de fibra de dendê foi eficiente para manter o diâmetro inicial do leito. A reação de esterificação em sistema *one-pot* com a nova fermentação realizada com fibra de dendê e torta de babaçu (1:1) foi realizada, e, após secagem do leito obteve-se 71,1% de conversão em 26h de reação no mesmo sistema reacional. O produto obtido nesta primeira reação foi colocado em uma segunda reação, na qual foi empregado um novo biorreator de leito fixo composto de um novo material fermentado e seco (biocatalisador), por mais 24h, atingindo a 89,2% de conversão à ésteres etílicos. O presente trabalho mostrou que foi possível obter um biocatalisador com alto potencial de síntese por FES em biorreator de leito fixo, que consiste em uma metodologia de baixo custo, e que tal biocatalisador pode ser aplicado em sistema *one-pot* para síntese de biodiesel.

Palavras-Chaves: Lipase, Fermentação em Estado Sólido, *Rhizomucor miehei*, Biorreator de leito fixo, Biocatálise, Sistema one-pot.

ÁVILA, Sabrini Natali da Silva. Production of lipase by solid state fermentation and application in biocatalysis using a single fixed bed reactor. Rio de Janeiro, 2017. Dissertation (Master in Biochemistry) - Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017

Lipases are a group of enzymes capable of catalyzing reaction of hydrolysis of ester linkages medium- and long-chain triacylglycerol as well reactions of esterification and transesterification. These commercially enzymes have high cost and so the search for new biocatalysts, obtained by low cost technology such as solid state fermentation (SSF), is necessary. Cake, a byproduct of vegetable oil extraction, Can be used as raw material of low cost for production of lipase by SSF. The aim of present work is to perform the lipase production by SSF using fixed bed bioreactor and, in this same system, synthetic reactions (*one-pot)*. The work is divided into two stages: the first is to study the production of lipase with esterification capacity by SSF in a fixed bed bioreactor and the second to perform reaction of esterification in the same bioreactor without manipulating the fermented solid containing the lipase, having this as bed. Lipase production was performed using babassu cake as substrate and *Rhizomucor miehei* by SSF, and the capacity synthesis was evaluated by standard reaction esterification in a stirred reactor using the dry fermented sample as the biocatalyst. The best result was obtained in the fermentation conditions of 35ºC, initial moisture of cake of 65%, air flow of 0,3 L/min and fermentation time of 48h. For the drying of the fermented cake by forced aeration, the air flow rate was 1,0 L/min and the drying time was 48 h. The reaction in column was performed with the dried fermented solid (*one-pot*), using as substrates oleic acid and ethanol, at 40ºC, with recycle of reactional medium. It was obtained 18,2% conversion in 6 h of reaction and 65,1% in 28h. In order the reaction in *one-pot* system, two control reactions were conducted using the same reactional medium: in stirred reactor and in fixed bed reactor with solid fragmented as biocatalyst. The value obtained in 6h of reaction in *one-pot* system was below the control made in a stirred reactor (71,4%), although in the 24h reaction the result was approximated in both types of reactors (75,4%). Results of the control with the solid fragmented as biocatalyst were 43,4% in 6h, but in 8h of reaction 63,3% of conversion was obtained, and 77,7% in 24h of reaction. The poor performance in *one-pot* system may have been caused by the retraction of fermented bed during the drying

step, with consequent preference path formation impairing the reaction of esterification. In order to evaluate this hypothesis, new fermentations were carried out with palm pulp fiber mixed with babassu cake to maintain the structure of the fermented medium during the drying phase of the material and to reduce the formation of reaction preference paths. It was observed that the blend containing 40% palm fiber was efficient to maintain the initial bed diameter. The reaction of esterification in a *one-pot* system with the new fermentation made with palm fiber and babassu cake (1: 1) was performed, and after drying the bed, 71,1% of conversion was obtained in 26 h of reaction same system reaction. The product obtained in this first reaction was placed in a second reaction, in which a new fixed bed bioreactor composed of a new material fermented and dry (biocatalyst) was used, for a further 24 h, obtained 89,2% of conversion to ethyl esters . The present work showed that it was possible to obtain a biocatalyst with high potential of synthesis by SSF in a fixed bed bioreactor, which consists of a low cost methodology, and that such a biocatalyst can be applied in a *one-pot* system for biodiesel synthesis.

Keywords: Lipase, Solid State Fermentation, *Rhizomucor miehei*, Fixed bed bioreactor, Biocatalysis, *one-pot* system.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. Lipases 3

2.1.1. Características gerais 3

2.1.2. Aplicações 7

2.2. Fermentação em Estado Sólido 9

2.2.1. Características gerais 9

2.2.2. Produção de lipases por FES 11

2.2.3. Biorreatores para FES 12

2.3. Emprego de sólido fermentado com atividade lipásica em biocatálise 16

2.3.1. Emprego de sólido fermentado na síntese de biodiesel 18

2.3.1.1. Reações com sólidos fermentados em biorreator de leito fixo 20

3. OBJETIVO 21

4. MATERIAIS E MÉTODOS 22

4.1. Micro-organismo 22

4.2. Fermentação em Estado Sólido 22

4.3. Secagem do Leito Fixo por aeração forçada 24

4.4. Determinação da atividade hidrolítica 24

4.5. Reação de esterificação padrão 25

4.6. Reação de esterificação *one-pot* 26

4.7. Determinação do teor de umidade 27

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28

5.1. Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo 28

5.1.1. Cinética da FES em biorreator de leito fixo 33

5.2. Secagem por aeração forçada em biorreator de leito fixo 36

5.3. Reação de esterificação em sistema integrado (*one-pot*) 39

6. CONCLUSÕES 49

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 50

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Reação da hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipases Fonte: JAEGER E REETZ (1998) **3**

Figura 2.2: Reações catalisadas por lipases Fonte: FREIRE e CASTILHO, (2008). **4**

Figura 2.3: Estrutura das formas aberta e fechada da lipase de Rhizomucor miehei Fonte: RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE (2010a). **6**

Figura 2.4: Esquema da hidrólise total de triglicerídeo catalisada pela lipase de Rhizomucor miehei (LRM) Fonte: RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE (2010a). **7**

Figura 2.5: Esquema do processo de crescimento do micro-organismo, interação com o substrato e produção de metabólitos durante a fermentação em estado sólido Fonte: HÖLKER E LENZ (2005). **10**

Figura 2.6: Cultivo de Babaçu. Fonte: TOBASA BIOINDUSTRIAL DE BABAÇU S.A. **12**

Figura 2.7: Biorreator do tipo bandeja Fonte: SILVA (2014) **14**

Figura 2.8: Biorreator tambor rotatório Fonte: MITCHELL et al. (2000). **14**

Figura 2.9: Biorreator agitado Fonte: SILVA (2014) **15**

Figura 2.10: Biorreator de Leito Fixo Fonte : ROBINSON E NIGAM (2003). **16**

Figura 2.11: Reação de transesterificação de óleo vegetal com um álcool para a produção de biodiesel. “R” representa grupamentos alquila contendo em média 16 a 22 carbonos e R1 é o grupamento alquila de álcool utilizado como agente de transesterificação. Fonte: RAMOS et al., (2011). **18**

Figura 4.1: Biorreator de leito fixo de 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro encamisado para controle de temperatura acoplado com kitassato com injeção de ar úmido utilizado na FES. **22**

Figura 4.2: Torta de babaçu com com tamanho de partículas inferior a 1,18 mm. **23**

Figura 4.3: Fibra da polpa de dendê com tamanho de partículas inferior a 2,8 mm (A) e partículas in natura (B). **24**

Figura 5.1: FES em leito fixo à 30°C, com vazão de ar igual a 0,8 L/min, 96h._____**28**

Figura 5.2: FES em leito fixo à 40°C com vazão de 0,8 L/min, 48h._____**30**

Figura 5.3: FES em leito fixo à 35°C com vazão de ar igual a 0,3 L/min, 48h._____**31**

Figura 5.4: FES em leito fixo à 35°C com vazão de ar igual à 0,5 L/min, 48h._____**32**

Figura 5.5: Ativiade hidrolítica das fermentações nas temperaturas de 30°C com vazão de 0,8 L/min, 35°C com vazões de 0,3 L/min e 0,5 L/min e 40°C com vazão de 0,8 L/min._____**32**

Figura 5.6: Capacidade de esterificação da lipase produzida por R. miehei nas temperaturas de 30°C com vazão de 0,8 L/min, 35°C com vazões de 0,3 L/min e 0,5 L/min e 40°C com vazão de 0,8 L/min._____**33**

Figura 5.7: Cinética da atividade hidrolítica da FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min, nas três alturas da coluna – Topo, Meio e Base._____**34**

Figura 5.8: Produção de lipase com capacidade de síntese por FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min. Tempo de reação de esterificação de 6h, avaliando três alturas da coluna de leito fixo - Topo, Meio e Base._____**34**

Figura 5.9: : Produção de lipase com capacidade de síntese por FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min. Tempo de reação de esterificação de 24h, avaliando três alturas da coluna de leito fixo - Topo, Meio e Base._____**35**

Figura 5.10: Reação de esterificação de PES seco por sistema de aeração forçada em 24h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base._____**36**

Figura 5.11: Reação de esterificação de PES seco por sistema de aeração forçada em 48h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base._____**37**

Figura 5.12: Umidade do PES seco por sistema de aeração forçada nos tempos de 24 e 48h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base. **38**

Figura 5.13: Viabilidade do PES produzido em biorreator de leito fixo e seco por aeração forçada armazenado à 4°C (■) e a 25°C (♦). Reação de esterificação feita em 6h. **39**

Figura 5.14: Viabilidade do PES produzido em biorreator de leito fixo e seco por aeração forçada armazenado à 4°C (■) e a 25°C (♦). Reação de esterificação feita em 24h. **39**

Figura 5.15: Reação de estertificação no sistema one-pot em três diferentes vazões - 3 mL/min (■), 12 mL/min (♦) e 22 mL/min (▲). **40**

Figura 5.16: Reação de esterificação na coluna no sistema one-pot (♦), com o PES fragmentado e recolocado no biorreator (■) e controle realizado em reator agitado (▲). **42**

Figura 5.17: Sólido fermentado e seco na coluna de leito fixo (A). Detalhe do encolhimento do sólido fermentado após processo de secagem (B). **43**

Figura 5.18: Reação de esterificação padrão em reator agitado realizada utilizado o PES com babaçu e fibra de dendê em diferentes granulometrias (peneirada < 2.8 e in natura) e porcentagens (20% e 40%), e controle realizado com PES somente com babaçu nos tempos de 6h e 24h de reação. **43**

Figura 5.19: FES com 20% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (A); FES com 40% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (B); FES com 20% de fibra de dendê in natura (C); FES com 40% de fibra de dendê in natura (D). **44**

Figura 5.20: Detalhe do encolhimento das FES com 20% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (A); FES com 40% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (B); FES com 20% de fibra de dendê in natura (C); FES com 40% de fibra de dendê in natura (D). **45**

Figura 5.21: Interação fungo-substrato na FES com 40% da fibra de dendê in natura antes do processo de secagem por aeração forçada. **45**

Figura 5.22: Interação fungo-substrato na FES com 40% da fibra de dendê in natura após do processo de secagem por aeração forçada._____**46**

Figura 5.23: Reação de esterificação em leito fixo utilizando FES com 40% de fibra de dendê in natura._____**46**

Figura 5.24: Reações consecutivas de esterificação na coluna com 40% da fibra de dendê in natura e babaçu._____**47**

Figura 5.25: Produto final obtido após reação de esterificação em sistema one-pot sem processos de downstream._____**48**

1. INTRODUÇÃO

Como alternativa de utilização de tecnologias limpas em processos industriais, as enzimas apresentam versatilidade nas aplicações biotecnológicas, pois são catalisadores naturais que podem ser obtidos facilmente na natureza, principalmente por micro-organismos por meio de vias fermentativas (FREIRE & CASTILHO, 2008).

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são triacilglicerol hidrolases, que geralmente atuam na interface orgânico aquosa, e catalisam reações como hidrólise de ligações ésteres bem como reações de esterificação e de transesterificação, com alta especificidade e eficácia. Possuem propriedades quimo-, régio-, e/ enantiosseletivas, o que torna estas enzimas altamente favoráveis para certas aplicações em nível industrial, como na produção de biodiesel, indústria de alimentos, e em processos de química fina (FREIRE & CASTILHO, 2008).

As lipases comercialmente disponíveis apresentam um preço muito elevado e por isso a busca de novos biocatalisadores, obtidos por tecnologia de baixo custo, como a fermentação em estado sólido (FES), se faz necessária. Como subprodutos da extração de óleos vegetais, são gerados tortas, que podem ser utilizadas como matéria-prima de baixo custo para a produção de lipase por FES (AGUIEIRAS et al., 2014). O emprego de biorreator de leito fixo na produção de lipase por FES pode proporcionar um maior controle de parâmetros como temperatura e teor de umidade do leito, com consequente aumento de produtividade em relação ao biorreator de bandeja.

Em biocatálise, biorreatores de leito fixo são os melhores para reações em larga escala devido à alta eficiência e à facilidade operacional. Neste tipo de biorreator, são utilizadas lipases imobilizadas como biocatalisadores e o substrato é bombeado para o interior da coluna com o auxilio de uma bomba peristáltica (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA, E FREIRE, 2015).

Na literatura, trabalhos utilizando sólidos fermentados como biocatalisadores com alto potencial para ser aplicado em processo de síntese de biodiesel já vem sendo descritos. Recentemente, AGUIEIRAS et al. (2014) descreveram a utilização de sólido fermentado, obtido por FES de torta de babaçu com o fungo *Rhizomucor miehei*, como biocatalisador para a síntese de biodiesel pela reação de esterificação. Tal biocatalisador se mostrou promissor, pois foi capaz de gerar 91% de ésteres etílicos em 8h de reação por 8 reações consecutivas. Em comparação com as enzimas comerciais Novozyme 435

e Lipozyme RM IM, este sólido fermentado apresentou conversão semelhante e um custo muito inferior (AGUIEIRAS et al., 2014).

O sistema integrado de produção de lipase e reação em leito fixo proposto pela primeira vez no presente trabalho, também denominado sistema one-pot, consiste no processo de fermentação em estado sólido seguido de reação enzimática utilizando o mesmo biorreator de leito fixo sem que ocorra, após a fermentação, a retirada do biocatalisador. Com isso, pretende-se que o sólido fermentado mantenha a sua estrutura natural, do emaranhado fungo-torta, para garantir uma boa porosidade para a passagem do meio reacional e evitar o entupimento do biorreator de leito fixo por sólidos finos soltos.

O presente trabalho teve como objetivo produzir lipase de *Rhizomucor miehei* com capacidade de síntese por FES em biorreator de leito fixo; secar o sólido fermentado por aeração forçada na própria coluna; e avaliar este leito de biocatalisador (constituído pelo sólido fermentado seco) na catálise da reação de esterificação entre ácido oléico e etanol na própria coluna.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipases

2.1.1. Características gerais

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo de enzimas capazes de catalisar a reação de hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis, assim como, em ambientes com restrição de água, a reação inversa de síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos (Figura 2.1) (FREIRE & CASTILHO, 2008). Sua peculiaridade é a capacidade de catalisar outros tipos de reações além da reação de hidrólise, dependendo do meio reacional, tais como as reações de acidólise, aminólise, alcoólise (transesterificações), esterificações e interesterificações (Figura 2.2).

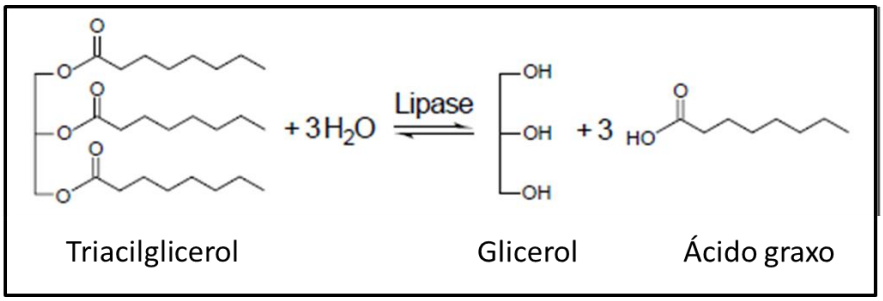

Figura 2.1: Reação da hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipases Fonte: JAEGER E REETZ (1998)

Estas enzimas apresentam alto potencial biotecnológico para aplicações como biocatalisadores industriais pelo fato de elas serem quimi-, régio- e/ou enantiosseletivas, estáveis em solventes orgânicos, não necessitarem de cofactores, e possuírem uma ampla especificidade por substrato (JAEGER; REETZ, 1998). Além disso, as reações utilizando lipases ocorrem em condições brandas de pH, temperatura e pressão, reduzindo a energia empregada no processo, e gerando produtos com melhor qualidade (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012).

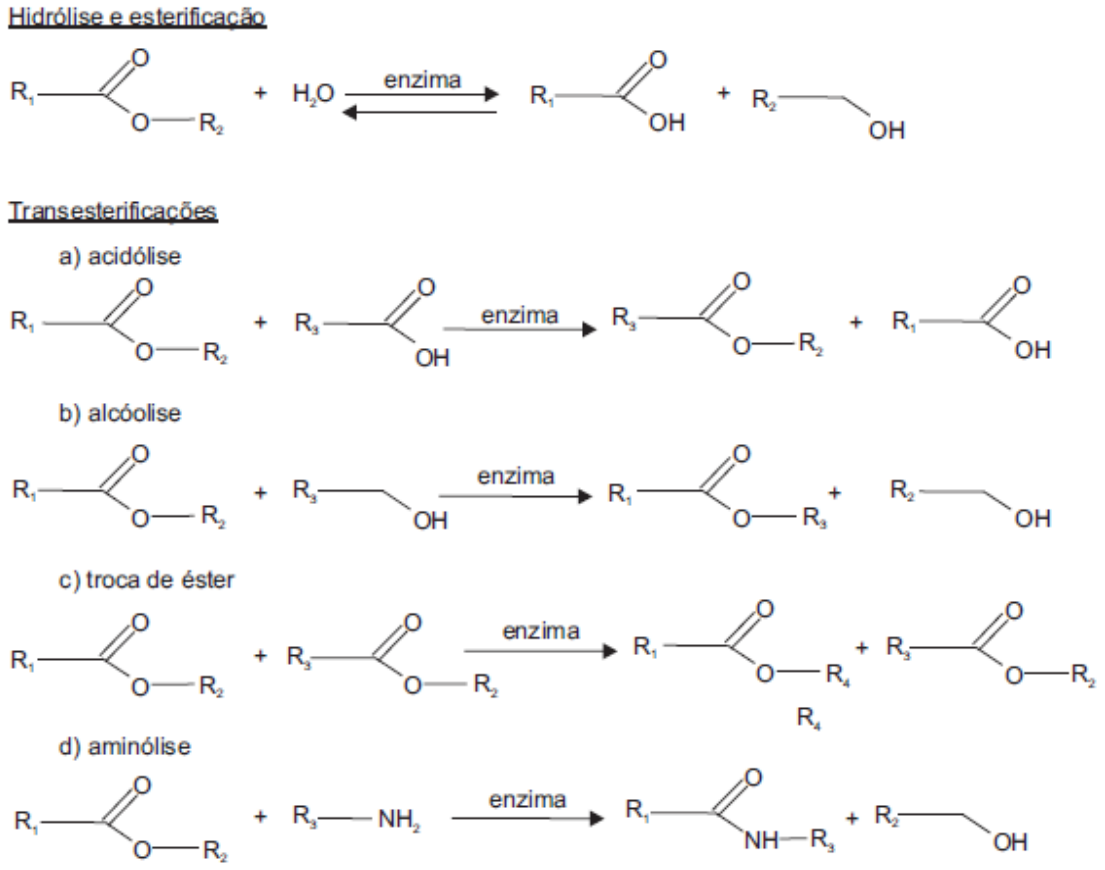

Figura 2.2: Reações catalisadas por lipases Fonte: FREIRE e CASTILHO (2008).

A elucidação da estrutura-função das lipases se tornou necessária para obter maiores informações sobre a relação da sua estrutura tridimensional com o seu mecanismo catalítico em aplicações para fins específicos. Todas as lipases apresentam uma estrutura conhecida como α/β hidrolases, e compartilham um sítio ativo conservado composto pela tríade catalítica serina-histidina-aspartato/glutamato (FREIRE & CASTILHO, 2008).

Na maioria das lipases, o acesso do substrato ao sítio ativo ocorre por meio de ativação interfacial, na presença de uma interface orgânico-aquosa, promovendo alterações conformacionais na enzima. Isto ocorre devido à presença de uma estrutura helicoidal chamada de "tampa", composta por *loops* das cadeias polipeptídicas presentes na superfície enzimática, que apresenta partes com caráter mais hidrofóbico, favorecendo sua abertura quando exposto em camada lipídica, e partes com caráter hidrofílico, responsável por cobrir o sítio ativo quando a lipase se encontra em meio aquoso. Portanto, para que a lipase seja ativa, é necessário um rearranjo conformacional

provocado pela presença da interface orgânico-aquosa, na qual a “tampa” se abre expondo o sítio ativo ao substrato (FREIRE & CASTILHO, 2008).

SARDA e DESNUELLE (1958) foram os primeiros a documentar o fenômeno de ativação interfacial de lipases, ao relatarem que a lipase pancreática se mostrou mais eficiente em uma superfície bidimensional de micelas, com isso, sugerindo que a interação da lipase em uma interface orgânico-aquosa provoca a ativação enzimática, e que esta ativação está diretamente relacionada com as alterações conformacionais da lipase. Porém, não podemos caracterizar a lipases a partir da existência de uma “tampa” e da ativação interfacial, visto que nem todas as lipases sofrem este processo, como por exemplo, a lipase de *Candida antarctica* B. Com isto, as lipases vem sendo definidas como carboxilesterases capazes de catalisar hidrólise de triacilgliceróis de cadeia média e longa (FREIRE & CASTILHO 2008).

Em relação à produção e distribuição das lipases na natureza, elas podem ser produzidas por animais, vegetais e micro-organismos. Entre as lipases de origem animal, as mais estudadas são as pancreática, hepática e gástrica (PAQUES & MACEDO, 2006). As lipases de origem vegetal podem ser extraídas de sementes, folhas e caules de vegetais superiores (PAQUES & MACEDO, 2006). Os micro-organismos são as principais fontes de produção de lipase. As lipases microbianas ganharam grande atenção industrial devido a sua maior estabilidade, produtividade, versatilidade e ampla especificidade do substrato, que conferem alto potencial biotecnológico a essas enzimas (THAKUR, 2012). Além do que, tais enzimas podem ser aplicadas com maior simplicidade em tecnologias de manipulação ambiental e genética (FREIRE & CASTILHO, 2008).

A produção de lipase microbiana pode ser realizada empregando a Fermentação em Estado Sólido (FES) ou a Fermentação Submersa (FS). Muitos micro-organismos são considerados potenciais produtores de lipases, mas dentre eles, fungos, bactérias e leveduras se destacam. Fungos filamentos são preferencialmente cultivados em FES, enquanto que bactérias e leveduras são comumente cultivadas em FS (THAKUR, 2012). Entre os fungos filamentosos produtores de lipases, os principais gêneros estudados são *Rhizopus sp*., *Aspergillus sp*., *Penicillium sp*., *Geotrichum sp*., *Mucor sp*., e *Rhizomucor sp*. (THAKUR, 2012).

O micro-organismo de interesse neste trabalho, o fungo filamentoso *Rhizomucor miehei*, se mostrou, em trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da UFRJ, como ótimo produtor de lipase por FES com capacidade de aplicação em biocatálise aquo-restita (AGUIEIRAS et al., 2014).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (LRM), anteriormente chamado de *Mucor miehei*, foi descrita pela primeira vez em 1973. Esta enzima extracelular foi a primeira lipase com estrutura conhecida (Figura 2.3). É uma enzima pequena, com aproximadamente 30 KDa. Sua estrutura é composta por uma tríade catalítica Ser-His-Asp com uma tripsina ligada a uma serina ativa oculta formando um curto fragmento helicoidal de superfície chamada de tampa. A presença de três pontes dissulfeto confere estabilidade a esta molécula (RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE 2010a).

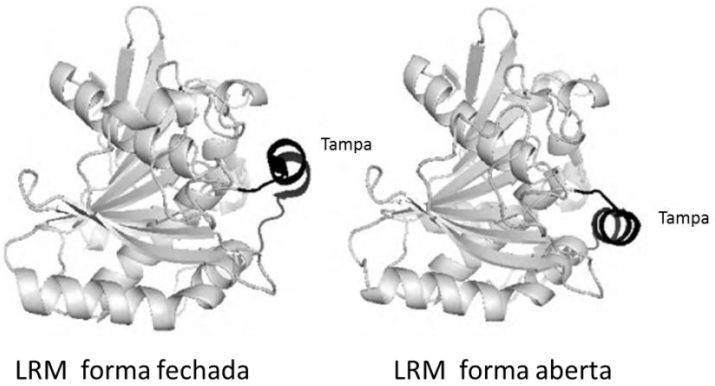

Figura 2.2: Estrutura das formas aberta e fechada da lipase de *Rhizomucor miehei* Fonte: RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE (2010a).

As LRMs são 1,3- regioespecífica, ou seja, são capazes de realizar a hidrólise dos ácidos graxos presentes na posição 1 ou 3 do triglicerídeo. Apesar desta característica, a migração espontânea do ácido graxo presente na região 2 para as posições 1 ou 3 faz com que a hidrólise total do triglicerídeo aconteça (Figura 2.4).

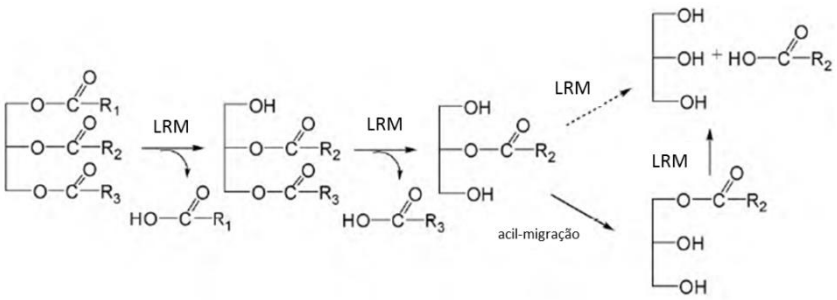

Figura 2.3: Esquema da hidrólise total de triglicerídeo catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* (LRM) Fonte: RODRIGUES E FERNANDEZ-LAFUENTE (2010a).

A lipase de *R. miehei* apresenta alta eficiência na reação de esterificação de diferentes ácidos graxos (com tamanho da cadeia variados) e diferentes tipos de álcool. Por isso, esta enzima apresenta grande aplicação no setor industrial, principalmente no setor alimentício, para modificações estruturais de óleos e gorduras (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE 2010a), assim como nas indústrias de biocatálise e química fina (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

2.1.2. Aplicações

As lipases apresentam alto potencial biotecnológico podendo ser utilizadas como biocatalisadores em diversos setores industriais, como por exemplo, a indústria alimentícia, farmacêutica, química fina, oleoquímica, de biodiesel, detergentes, cosméticos, de polpa de papel, de couro, de biossensores, no tratamento de efluentes, entre outras (FREIRE & CASTILHO, 2008).

Na indústria alimentícia, as lipases podem ser aplicadas na hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em vários alimentos com o intuito de obter ácidos graxos livres. De acordo com as características dos ácidos graxos gerados, comprimento da cadeia de carbonos e grau de insaturações, é conferido aos alimentos sabor e aroma peculiar, e um papel nutricional importante neste segmento industrial (JAEGER; REETZ, 1998). Além disso, tais enzimas podem ser aplicadas em outros processos industriais como, a fabricação de pães, onde esta enzima é utilizada para melhorar a textura da massa, na indústria de laticínios, atuando no processo de hidrólise da gordura do leite e para acelerar os processos de maturação de queijos (FREIRE & CASTILHO, 2008), e na produção de lipídeos estruturados, substituindo ou alterando posições de

ácidos graxo em triglicerídeos para conferir melhores propriedades organolépticas e alto valor nutricional (Zhang et al., 2006)

Na indústria farmacêutica e de química fina, o uso de lipases ocorre com a finalidade de remoção seletiva de certos compostos e de resolução de misturas racêmicas. A utilização de lipases nesse ramo industrial tem aumentado cada vez mais (MANOEL et al., 2012 e 2013).

Na área ambiental, lipases vêm sendo aplicadas para o tratamento de efluentes de diversas origens. Foi relatado o uso de lipases para tratar efluentes de resíduos domésticos, de tubulação de esgoto, fossas sépticas, sumidouros, matadouros, restaurantes, entre outros tipos (JAEGER E REETZ, 1998; MASSÉ et al., 2001; DHARMSTHITI E KUHASUNTISUK, 1998 *apud* FREIRE & CASTILHO, 2008). CAMMAROTA E FREIRE (2006) utilizaram lipases em pré- tratamento de efluentes ricos em gordura derivados de indústrias de laticínios, abatedouros de aves e pescado.

O interesse na utilização de lipases para a produção de biodiesel vem aumentando nos últimos anos e cada vez mais estudos têm sido voltados para este propósito (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA, 2011). No setor industrial, a via química para produção biodiesel encontra-se bem estabelecida, porém esta via apresenta uma serie de desvantagens como: a dificuldade de recuperar o subproduto gerado (glicerol), a necessidade de remoção do catalisador alcalino que gera uma grande quantidade de efluente que necessita de tratamento, pois são altamente tóxicos, e a necessidade de controlar a quantidade de ácidos graxos livres e água presentes na matéria prima (FUKUDA, KONDO, E TAMALAMPUDI, 2009). Neste contexto, a metodologia de produção de biodiesel utilizando enzima apresenta impacto positivo em vários fatores, como: a possibilidade de utilização de matérias primas de qualidades variáveis (como óleos com alto teor de acidez) devido à capacidade de realizar reações de transesterificação e esterificação, ser realizado um processo com poucas etapas, produzir um glicerol de melhor qualidade, obter uma melhor separação de fases, não formar sabão, ter menor consumo de energia, e menor produção de efluentes (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA, 2011).

Entre outras aplicações industriais, está a utilização de lipases como biossensores para a detecção de triacilglicerois na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas, na produção de aromas e surfactantes na indústria

de cosméticos e perfumes, na produção de emolientes usados em cremes de pele e cremes bronzeadores em indústrias de cosméticos, na manufatura de tecidos de algodão, em associação com outras hidrolases, e na remoção da gordura na indústria de couro (FREIRE & CASTILHO, 2008).

2.2. Fermentação em Estado Sólido

2.2.1. Características gerais

O Brasil é uma das mais importantes economias agrícola do mundo, sendo responsável pela produção de diversos insumos agroindustriais. O setor agroindustrial brasileiro é responsável por gerar cerca de 597 milhões de toneladas de resíduos por ano. Porém, tais resíduos não apresentam valor agregado e são dispostos no meio ambiente conferindo grande potencial poluidor (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Portanto, a utilização desses resíduos como matéria prima, apresenta vantagens uma vez que são coprodutos da indústria agrícola, assim a sua obtenção não compete com o setor alimentício, e são matérias primas ricas em nutrientes, sendo assim favorável como substrato alternativo na obtenção de diversos produtos de alto valor agregado (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Neste contexto, surge a fermentação em estado sólido (FES) como alternativa para aproveitamento dos resíduos sólidos de origem agroindustriais, desempenhando papel de destaque na síntese de diversos produtos de grande interesse para os segmentos industrial e econômico (SINGHANIA et al., 2009).

A fermentação em estado sólido (FES) consiste em um processo fermentativo que envolve o crescimento de micro-organismos utilizando partículas sólidas como meio de cultivo, na ausência ou quase ausência de água livre. Portanto, neste processo, o meio sólido em questão necessita possuir umidade suficiente para que ocorra o crescimento e desenvolvimento metabólico do micro-organismo (PANDEY, 2003).

A FES teve origem na China, como tecnologia para a elaboração de alimentos tais como o koji e sakê. Devido às suas vantagens, como menor possibilidade de contaminação, o menor gasto energético e a alta produção de uma grande variedades de produtos, começaram a ser desenvolvidos processos de FES em outros países para aplicações industriais (HÖLKER & LENZ, 2005).

Umas das características da FES é a capacidade de apresentar condições mais próximas ao habitat natural dos fungos filamentosos. Com isso, estes micro-organismos são os mais aplicáveis a este processo. Devido à sua característica de produzir hifas durante o seu crescimento, os fungos filamentosos apresentam um ótimo desenvolvimento na superfície das partículas sólidas, com grande capacidade de penetração entre partículas e no interior destas (Figura 2.5) (PANDEY, 2003).

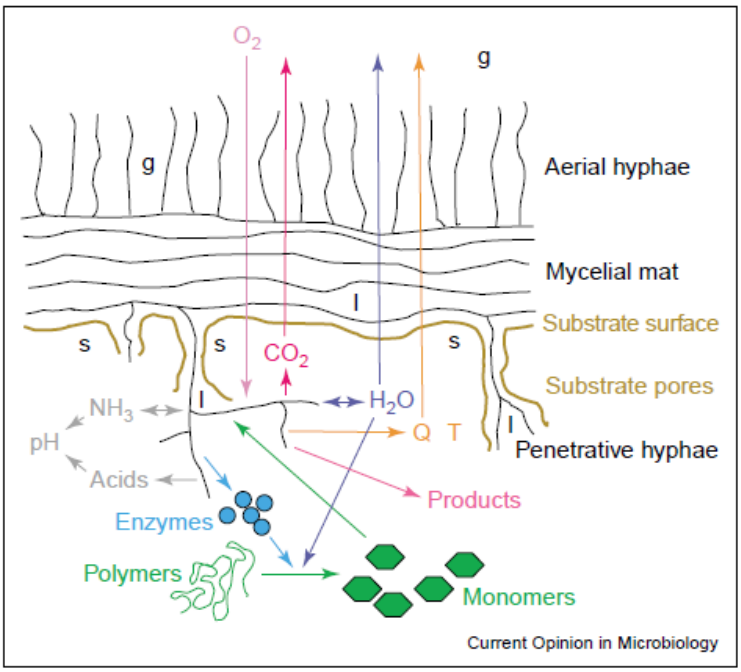

Figura 2.5: Esquema do processo de crescimento do micro-organismo, interação com o substrato e produção de metabólitos durante a fermentação em estado sólido Fonte: HÖLKER E LENZ (2005).

O material sólido utilizado na FES pode atuar como a fonte de nutrientes e como suporte, suplementado ou não com os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo, como por exemplo, fontes de carbono e de nitrogênio (SINGHANIA et al., 2009).

A FES apresenta certas vantagens em relação à fermentação submersa (FS), como por exemplo, a capacidade de produzir metabólitos de forma concentrada, o fácil processo de recuperação no meio de fermentação, e a utilização de resíduos como substrato que confere baixo custo a esta tecnologia (SINGHANIA et al., 2009).

A FES tem sido aplicada em diversas áreas de bioprocessos, como biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação de resíduos agrícolas para enriquecimento

nutricional, e obtenção de produtos de alto valor agregado como antibióticos, alcaloides, fatores de crescimento de plantas, enzimas, ácidos orgânicos, biossufactantes, biopesticida, aromas e etc (PANDEY, 2003).

Esta tecnologia pode ser aplicada na produção de enzimas visando a obtenção de biocatalisadores de baixo custo e tornado assim processos de biocatálise viáveis industrialmente e economicamente competitivos. Neste contexto, resíduos sólidos provenientes da extração de óleos vegetais podem ser utilizados como meio de cultivo na FES para a produção de lipase, pois tais resíduos são de baixo custo e são abundantes em países como o Brasil (AGUIEIRAS et al., 2014).

2.2.2. Produção de lipases por FES

Muitos micro-organismos, entre fungos, bactérias e leveduras, são considerados ótimos produtores de lipase. Os fungos filamentosos são os mais utilizados para produção de lipase por FES devido a sua adaptação para crescer neste tipo de fermentação. Entre os fungos filamentosos utilizados para a produção de lipase por FES, podemos citar *Aspergillus niger*, *Penicillium restrictum*, *Rhizopus oligosporous*, *Rhizopus delemer* e *Aspergillus oryzae* (KUMAR E RAY, 2014). Embora seja menos estudada, a utilização de bactérias e leveduras para a produção de lipases por FES também vem sendo realizada com sucesso. A bactéria *Burkholderia cepacia* foi empregada na produção de lipase por FES e gerou um biocatalisador com alta capacidade de síntese de biodiesel (LIU et al., 2013; SOAREs et al., 2013; SALUM et al. 2010). Leveduras como *Candida rugosa* e *Yarrowia lipolytica* apresentaram alta atividade lipásica quando cultivadas em FES (BENJAMIN E PANDEY, 1997; IMANDI, KARANAM, E GARAPATI, 2013).

Coprodutos e Resíduos agroindustriais são os principais substratos utilizados para a produção de lipase por FES; sobretudo os derivados de oleaginosas, devido ao alto teor de lipídeos presente, que pode atuar como indutor da produção de lipase. Exemplos de resíduos agroindustriais utilizados como substrato para a produção de lipase por FES são farelo de arroz, torta de babaçu, farelo de soja, torta da polpa de palma, entre outros (KUMAR E RAY, 2014).

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é uma oleaginosa da família das palmáceas (Figura 2.6) que apresenta grande exploração na região nordeste do Brasil, sendo o Maranhão o maior produtor (cerca de 80% da produção de babaçu concentra-se neste

estado). A partir do processamento da amêndoa são gerados dois tipos de óleos de babaçu – um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico) (DESER, 2007).

Figura 2.6: Cultivo de Babaçu. Fonte: TOBASA BIOINDUSTRIAL DE BABAÇU S.A.

A extração do óleo de babaçu gera como subproduto a torta, que normalmente é destinada para a indústria de rações de aves e suínos (DESER, 2007). Esta torta, rica em nutrientes, mostrou-se ótimo substrato para produção de lipase por FES em trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa. Lipases de *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005), *P. verrucosum*, *P. brevicompactum* (SILVA et al., 2011) e *Rhizomucor miehei* (AGUIEIRAS et al., 2014) foram produzidas por FES utilizando a torta de babaçu como substrato.

2.2.3. Biorreatores para FES

Durante a FES, o calor está diretamente ligado às atividades metabólicas dos micro-organismos. De acordo com a configuração do biorreator, na fase inicial da fermentação, a temperatura e as concentrações de oxigênio são as mesmas ao longo de todo o leito de FES, contudo, a medida que a fermentação progride, o oxigênio ali presente se difunde, é metabolizado e com isto o calor é liberado, porém não é facilmente dissipado devido a má condutividade térmica do substrato. Portanto, é

possível observar gradientes de temperatura e concentrações gasosas ao longo do leito fermentado. Estas diferenças observadas prejudicam diretamente a produtividade em termos de biomassa e produção de metabólitos (GHILDYAL et al., 1994).

Neste contexto, a configuração do biorreator utilizado no processo de FES se torna importante para o melhor controle dos parâmetros fermentativos como: temperatura, umidade e oxigenação.

Normalmente, os processos industriais são realizados em biorreatores do tipo bandeja ou tambor rotatório. O biorreator do tipo bandeja consiste em um reator mais simples, sem aeração forçada ou agitação do substrato sólido. As bandejas são preenchidas com uma fina camada de substrato (entre 5 e 15 cm de profundidade), com altura necessária para evitar superaquecimento e para manter condições aeróbicas de crescimento do micro-organismo, e a FES é conduzida em câmaras com circulação de ar úmido. As bandejas podem ser feitas de madeira, alumínio ou plástico. Geralmente são abertas no topo, ou possuem orifícios no fundo para promover a aeração (MITCHELL et al., 2000).

Os únicos parâmetros controlados com a utilização dos biorreatores do tipo bandeja é a temperatura e a umidade relativa do ar da câmara onde ocorre a fermentação (MITCHELL et al., 2000). Devido ao fato da circulação de ar ocorre em torno das superfícies do biorreator, a transferência de massa na bandeja é limitada por difusão e a transferência de calor por condução (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002).

O biorreator do tipo bandeja, apesar se apresentar um *design* simples, ao ser aplicado em nível industrial, requer grandes áreas e são difíceis de manusear. Além disso, a espessura do leito não pode ser tão alta devido à dificuldade de transferência de calor e massa ao longo dele. Neste tipo de biorreator, por causa da dificuldade de aeração no interior de leito, ocorre o acumulo de calor, gerando gradientes de temperatura, com isto, prejudicando o crescimento do micro-organismo e o rendimento do produto final (Figura 2.7) (ROBINSON E NIGAM, 2003; MITCHELL, BEROVIC, E KRIEGER, 2002).

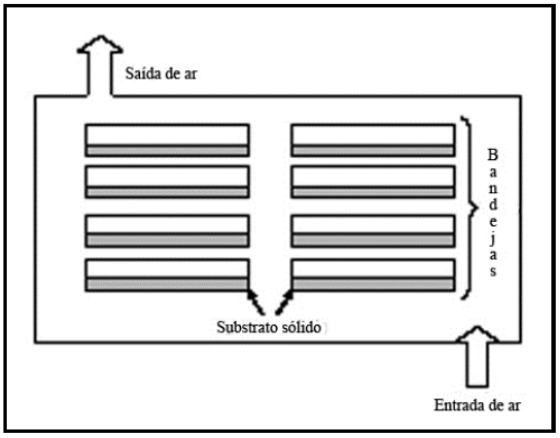

Figura 2.7: Biorreator do tipo bandeja Fonte: SILVA (2014)

O tambor rotatório apresenta como caraterística o aspecto de cilindro horizontal ou inclinado na qual a camada de substrato ocupa cerca de 10 a 40% do volume do biorreator. A agitação ocorre devido à rotação do tambor de forma leve, promovendo a mistura do substrato sólido dentro do reator, a melhor transferência de calor e massa, e a melhor distribuição de nutrientes. A aeração ocorre devido à presença de uma entrada e saída de ar (Figura 2.8) (ROBINSON E NIGAM, 2003; MITCHELL, BEROVIC, E KRIEGER, 2002).

Portando, neste tipo de biorreator, como já foi dito, o seu movimento de agitação promove uma melhor transferência de calor e massa, mas, gera desvantagens como danos aos micélios fúngicos e aglomeração do substrato em certas partes do biorreator (GHILDYAL et al., 1994).

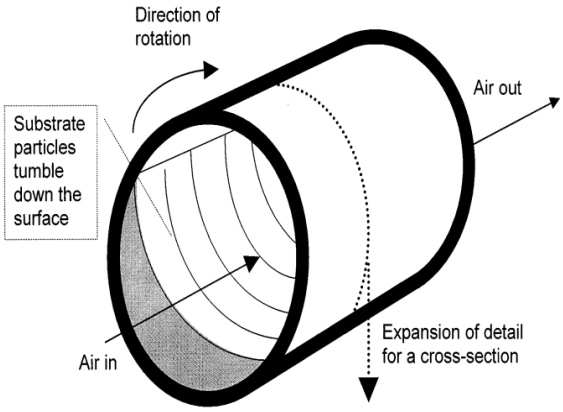

Figura 2.8: Biorreator tambor rotatório Fonte: MITCHELL et al., (2000)

Outro tipo de configuração de biorreator bastante usado são os biorreatores agitados, que podem ser horizontal ou vertical. O biorreator agitado horizontal é mais similar ao tambor rotatório, exceto pelo fato da agitação ser promovida pela presença de pás ou raspadeiras presa em um eixo central, enquanto que no tambor rotatório a agitação ocorre devido ao movimento de rotação do próprio tambor. Neste biorreator a agitação pode ser continuo ou intermitente, e a aeração é promovida por injeção de ar no reator. O biorreator agitado vertical é mais similar ao biorreator de leito fixo. O que difere é a presença do eixo central com as pás ou raspadeiras responsáveis pela agitação, que também pode ser continua ou intermitente. Contudo, este biorreator apresenta vantagens quando comparado com o leito fixo pelo fato de o seu sistema de agitação evitar gradientes de temperatura e umidade ao longo do leito, promovendo um sólido fermentado mais uniforme (Figura 2.9) (MITCHELL E BEROVIC, 2010).

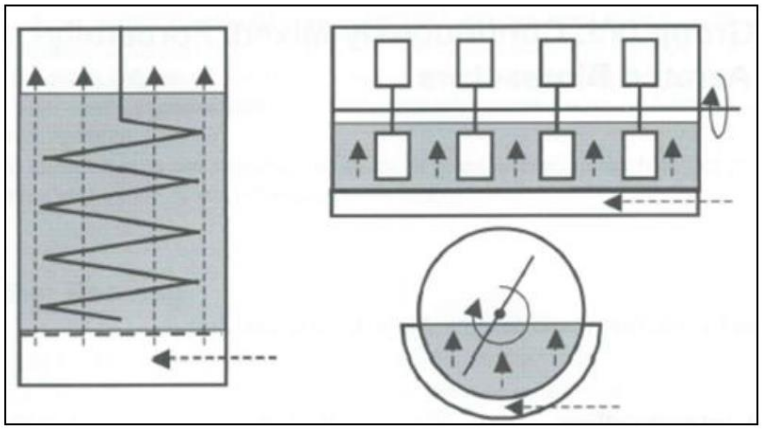

Figura 2.9: Biorreator agitado Fonte: SILVA (2014)

Neste trabalho, o biorreator de interesse é o de leito fixo. Este biorreator consiste em uma coluna preenchida com o substrato sólido. O processo fermentativo ocorre de forma estática (sem agitação), e na sua base ocorre à aplicação da aeração do leito por meio de injeção de ar úmido, para evitar o ressecamento do substrato mantendo a umidade do sólido fermentado. O controle da temperatura é feito a partir da colocação das colunas em um banho com temperatura controlada ou pela de utilização de colunas com jaqueta d'água (Figura 2.10) (ROBINSON E NIGAM, 2003).

O leito fixo tem como vantagem a reduzida contaminação bacteriana pelo fato de ser um sistema fechado, ao contrário do biorreator do tipo bandeja. Além disso, a

aeração forçada aplicada neste tipo de biorreator melhora da transferência de calor e massa ao longo do leito (GHILDYAL et al., 1994).

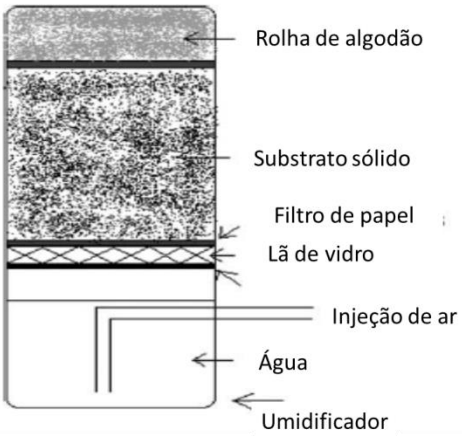

Figura 2.10: Biorreator de Leito Fixo Fonte: ROBINSON E NIGAM(2003)

2.3. Emprego de sólido fermentado com atividade lipásica em biocatálise

Em biocatálise o emprego de enzimas comerciais como biocatalisadores para obtenção de produtos de baixo valor agregado encarem o processo e consequentemente o produto final. Além disso, baixa produtividade e do longo tempo reacional normalmente empregado neste processo faz com que a via enzimática não seja favorável industrialmente (SALUM et al., 2010).

Em busca de biocatalisadores de baixo custo que possam ser empregados em nível industrial, os sólidos fermentados, produzidos utilizando como substratos resíduos ou coprodutos agroindústriais derivados da extração de óleos vegetais, baratos e abundantes no Brasil, para o crescimento do micro-organismo produtor de lipase, surgem como alternativa. A obtenção deste biocatalisador, além do baixo custo de produção, apresenta a vantagem de não necessitar de etapas de dowstream – como extração, purificação e imobilização enzimática – que são processos que encarecem mais ainda o produto final. (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

Outro parâmetro importante na aplicação de enzimas em biocatálise, é a possibilidade de reuso desta enzima, pois quanto mais a enzima puder ser reutilizada menor será a contribuição do custo enzimático no preço do produto final. Normalmente

enzimas comerciais podem ser utilizadas diversas vezes, com isto, ao analisar o potencial catalítico de um sólido fermentado, deve ser levado em conta a capacidade de reuso deste biocatalisador (AGUIEIRAS et al., 2014).

. SALUM et al. (2010) observaram que em reações consecutivas de 47h o sólido fermentado manteve a sua atividade próxima a 100% por dois ciclos. SOARES et al. (2013) utilizaram o sólido fermentado em reações de esterificação consecutivas de 48h e observaram que a conversão se manteve em torno 90% durante seis ciclos. AGUIEIRAS et al. (2014) observou que o sólido fermentado produzido manteve atividade após dez ciclos, com valores de conversão acima de 95% dos valores iniciais durante oito ciclos.

Portanto, como foi visto na literatura, sólidos fermentados produzidos e aplicados em biocátalise podem ser reutilizados sem perder atividade e por isso apresentam grande potencial para ser aplicado como biocatalisadores em processos de síntese substituindo as enzimas comerciais.

Em processos industriais, ao *desing* do biorreator utilizado é essencial para garantir uma alta eficiência na reação e o melhor controle de outros parâmetros reacionais como: transferência de massa, homogeneidade do meio reacional, temperatura, estabilidade enzimática e recuperação do biocatalisador (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

Biorreatores de leito fixo são comumente usados em reações de biocatálise, pois são bem eficientes e fáceis de operar. Neste tipo de biorreator, são normalmente utilizadas lipases imobilizadas em suportes porosos e o substrato é bombeado para o interior da coluna com o auxilio de uma bomba. O tamanho da partícula do biocatalisador utilizado influencia diretamente nas limitações de transferência de massa no interior do leito. A utilização de partículas menores é uma alternativa para melhorar a transferência de massa, porém, o uso dessas partículas, também pode promover a queda de pressão influenciando o fluxo de substrato, com isso afetando a eficácia da reação (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA, E FREIRE, 2015).

O sistema integrado de produção de lipase e reação em leito fixo, também denominado sistema *one-pot*, consiste em um processo de fermentação em estado sólido seguido de uma reação enzimática utilizando o mesmo biorreator de leito fixo sem que ocorra, após a fermentação, a retirada do biocatalisador. Com isso pretende-se que o

PES mantenha a sua estrutura de emaranhado fungo-torta, apresentando uma maior porosidade e evitando o empacotamento.

2.3.1. Emprego de sólido fermentado na síntese de biodiesel

O biodiesel (ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa) aparece como um combustível alternativo para substituir o diesel de petróleo por ser ecologicamente mais favorável e ser derivado de recursos biologicamente renováveis (YU et al., 2013). Este biocombustível pode ser produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais em combinação com um álcool de cadeia curta (KNOTHE, 2006). A reação de transesterificação é a principal rota empregada para a produção de biodiesel industrialmente. Neste método, um mol de triacilglicerol reage com três moles de álcool, na presença de um catalisador alcalino, ácido ou enzimático, como mostrado na Figura 2.11 (RAMOS et al., 2011).

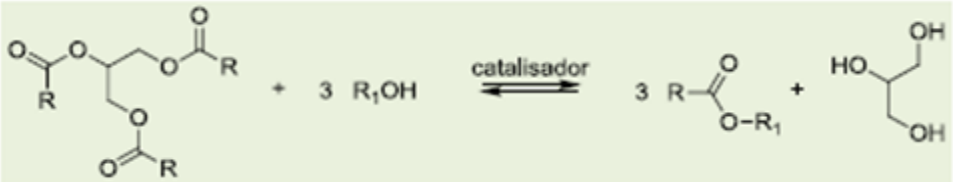

Figura 2.11: Reação de transesterificação de óleo vegetal com um álcool para a produção de biodiesel. “R” representa grupamentos alquila contendo em média 16 a 22 carbonos e R1 é o grupamento alquila de álcool utilizado como agente de transesterificação. Fonte: RAMOS et al., (2011).

Outra rota de obtenção de ésteres monoalquílicos é por meio da reação de esterificação, dos ácidos graxos livres com o álcool. Essa rota emprega matérias primas com alto teor de ácidos graxos livres (acidez), que são em geral mais baratas (RAMOS et al., 2011). A reação de transesterificação se difere da reação de esterificação pelo fato de a primeira apresentar uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis para transformar o triacilglicerol em biodiesel, onde diacilglicerol e monoacilglicerol são formados como intermediários. E a segunda, a reação de esterificação, são os ácidos graxos livres que são transformados diretamente em biodiesel (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA 2011).

A produção industrial de biodiesel utiliza a rota da transesterificação e emprega catalisador químico alcalino (ROBLES-MEDINA et al., 2009). A catálise alcalina apresenta como vantagem a alta conversão do óleo a biodiesel em pouco tempo (cerca

de 1h), além do baixo custo do catalisador alcalino utilizado (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA 2011), atendendo a demanda econômica industrial. Contudo, tal método apresenta uma série de inconvenientes como: dificuldade de recuperar o subproduto gerado (glicerol); a necessidade de remoção do catalisador alcalino, responsável por gerar uma grande quantidade de efluente tóxicos que necessitam ser tratados; e a necessidade de controlar a quantidade de ácidos graxos livres e água presentes na matéria prima (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). As desvantagens apresentadas por esta rota estimularam pesquisadores e empresas a buscarem métodos alternativos de produção de biodiesel, como por exemplo, a catálise enzimática (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA 2011).

A metodologia de produção de biodiesel utilizando enzima apresenta impacto positivo em vários fatores, como: (1) a possibilidade de utilização de matérias primas de qualidades variáveis (como óleos com alto teor de acidez), devido à capacidade destes biocatalisadores de realizar reações de transesterificação e esterificação; (2) a síntese ocorrer em um processo com poucas etapas; (3) o glicerol gerado ser de melhor qualidade; (4) a facilidade em obter uma melhor separação de fases; (5) a não formação sabão; (6) o menor consumo de energia durante o processo; (7) e a não produção de efluentes alcalinos (FREIRE, SOUSA, E CAVALCANTI-OLIVEIRA 2011).

O alto custo das enzimas é um dos maiores obstáculos para que a rota enzimática seja amplamente utilizada industrialmente. Portanto, a partir da tecnologia de fermentação em estado sólido, é possível produzir um biocatalisador de baixo custo que possa ser aplicado em processo de síntese de biodiesel (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA E FREIRE, 2015). Durante o processo de FES, as células microbianas crescem e são imobilizadas espontaneamente na matriz sólida, assim como as lipases secretadas. No final do processo de FES, todo esse conjunto pode ser utilizado como biocatalisador, dispensando as etapas de extração, purificação e imobilização da lipase, reduzindo ainda mais o custo de produção do biocatalisador (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

Recentemente, AGUIEIRAS et al. (2014) descreveram a utilização de sólido fermentado, obtido por FES de torta de babaçu pelo fungo *Rhizomucor miehei*, para catalisar a síntese de biodiesel pela reação de esterificação. Tal biocatalisador se mostrou promissor para a produção de biodiesel, pois foi capaz de gerar 91% de ésteres

etílicos em 8h de reação por 8 reações consecutivas. Em comparação com as enzimas comerciais Novozyme 435 e Lipozyme RM IM, este sólido fermentado apresentou conversão semelhante (AGUIEIRAS et al., 2014).

2.3.1.1. Reações com sólidos fermentados em biorreator de leito fixo

Poucos trabalhos são descritos na literatura sobre a produção de biodiesel empregando sólido fermentado como biocatalisador em biorreator do tipo leito fixo (SALUM et al., 2010; SOARES et al., 2013; SOARES et al., 2015).

SALUM et al. (2010) descreveram o uso de sólido fermentado em biorreator de leito fixo para catalisar a reação de transesterificação do óleo de soja em sistema livre de solvente, com 95% de conversão em 46h de reação. O sólido fermentado foi produzido utilizando como substrato farelo de semente de girassol e bagaço de cana (1:1). O bagaço de cana foi usado com o intuito de dar volume e estrutura ao sólido fermentado, visto que, ao utilizar somente o farelo de semente de girassol, o leito compactou e com isso não havia poros suficientes para ser empregado em uma reação de leito fixo.

O sólido fermentado produzido por SALUM et al. (2010) também foi utilizado em biorreator de leito fixo em dois outros trabalhos do mesmo grupo de pesquisa. (SOARES et al., 2013; SOARES et al., 2015). SOARES et al. (2013) utilizaram este biocatalisador para a produção de biodiesel em biorreator de leito fixo pela rota da esterificação dos ácidos graxos livres da borra ácida de soja hidrolisada, obtendo cerca de 92% de conversão em 31h de reação, em sistema livre de solvente. O sólido fermentado pôde ser reutilizado com sucesso.

Nos trabalhos descritos até o momento, o sólido fermentado foi produzido em biorreator do tipo bandeja, fragmentado, seco e então adicionado ao biorreator de leito fixo para a reação. O que difere da proposta do presente trabalho, que consiste na produção do biocatalisador em biorreator de leito fixo seguido de secagem e reação neste mesmo biorreator.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da produção de lipase de *Rhizomucor miehei* por fermentação em estado sólido utilizando biorreator de leito fixo e neste mesmo sistema realizar reação de esterificação (one-pot) entre ácido oléico e etanol visando a futura aplicação na síntese de biodiesel.

Objetivos específicos

Estudo de Fermentação

- ✓ Definir as condições de produção da lipase de *Rhizomucor miehei* com capacidade de esterificação por FES em reator de leito fixo.

Estudo de secagem

- ✓ Definir as condições do processo de secagem por aeração forçada do sólido fermentado produzido no biorreator de leito fixo.

Estudo de biocatálise

- ✓ Estudar a reação de esterificação entre ácido oléico e etanol no mesmo reator de leito fixo, sem manipular o sólido fermentado contendo a lipase, tendo este como leito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi o fungo filamentoso *Rhizomucor miehei* pertencente à coleção de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da UFRJ. A cepa foi armazenada em tubo inclinado com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Ágar) e mantido a 4ºC. Para a obtenção dos esporos, o fungo foi inoculado em meio PDA e incubado por 7 dias à 30ºC. Após esse período, os novos esporos foram raspados com o auxílio de pérolas de vidro e recuperados em solução de 1% v/v de tween 80 em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), formando uma suspensão. A concentração de esporos por mililitro (mL) de solução foi determinada por contagem em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer (GUTARRA et al., 2009).

4.2. Fermentação em Estado Sólido

O biorreator de leito fixo utilizado consiste em uma coluna de vidro com 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro (Figura 4.1). Para o controle da temperatura, a coluna possui uma jaqueta d'água conectada a um banho termostático. A aeração forçada é realizada através da parte inferior da coluna, a qual é acoplada a um kitassato com água estéril, onde o ar é borbulhado na água para umidificação. Antes da entrada de ar no kitassato existe um filtro para esterilização do mesmo. O controle da taxa de aeração foi feito por meio de rotâmetros.

Figura 4.1: Biorreator de leito fixo de 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro encamisado para controle de temperatura acoplado com kitassato com injeção de ar úmido utilizado na FES.

Como meio de cultivo foram utilizadas a torta de babaçu (Tabela 4.1 e Figura 4.2), subproduto da produção de óleo de babaçu, cedida pela TOCANTINS BABAÇU S.A, e a fibra da polpa de dendê (Tabela 4.2 e Figura 4.3), subproduto da produção do óleo de dendê, cedida pela AGROPALMA S.A.

Tabela 4.1: Composição da torta de babaçu Fonte: SILVA (2014)

Componente	% (m/m)
Lipídios	16
Proteínas	20
Umidade	10
Fibras	50
Cinzas	4

Figura 4.2: Torta de babaçu com com tamanho de partículas inferior a 1,18 mm.

Tabela 4.2: Composição da Fibra da polpa de dendê

Componente	% (m/m)
FDN	70
Proteínas	5
Lipídios	22
Cinzas	3

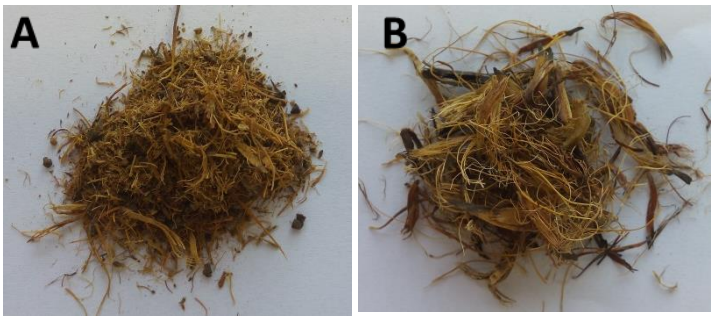

Figura 4.3: Fibra da polpa de dendê com tamanho de partículas inferior a 2,8 mm (A) e partículas *in natura* (B).

Foram realizadas fermentações utilizando como substrato a torta de babaçu pura (tamanho de partícula inferior a 1,18 mm) ou uma mistura da torta de babaçu com fibra de dendê. A fibra foi empregada em duas proporções na mistura, 20 e 40 %(m/m), na forma *in natura* e triturada (tamanho de partícula inferior a 2,8 mm). As condições de fermentação foram as mesmas utilizadas para a torta de babaçu pura.

No processo de FES, foram utilizadas 30g de substrato (torta de babaçu ou fibra da polpa de dendê) sem suplementação, em cada biorreator de leito fixo. O substrato autoclavado foi inoculado com 10^7 esporos/g de substrato (GUTARRA et al., 2009) e a umidade inicial do substrato foi de 65 %. Foram avaliadas as vazões de 0,3 L/min, 0,5 L/min e 0,8 L/min e temperaturas de 30°C, 35°C e 40°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo diferentes para cada temperatura. As fermentações foram conduzidas em duplicata.

4.3. Secagem do Leito Fixo por aeração forçada

O sólido fermentado presente no biorreator de leito fixo foi seco por meio de injeção de ar seco, com vazão igual a 1,0 L/min e temperatura 35°C. Foram avaliados os tempos de secagem de 24 e 48h. Os experimentos de secagem foram conduzidos em duplicata.

4.4. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica do preparado enzimático sólido (PES), foi determinada por meio da reação de hidrólise do óleo de soja (5% m/v) emulsionado em goma arábica (5% m/v) e em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (100 mM). O PES seco foi adicionado (0,2 g (m/v)) em 20 mL da emulsão e incubados por 20 minutos a 35ºC em banho com agitação a 200 rpm. A reação foi interrompida com a adição de 20 mL de acetona/etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos livres foram titulados com solução 0,04 mol.L de NaOH em titulador automático

Mettler modelo DG20 até o pH 11. O branco reacional foi obtido adicionando o preparado enzimático após a adição de 20 mL da solução acetona/etanol.

A atividade (U) foi determinada segundo a Equação 1. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de lipase que produz 1µmol de ácido graxo livre por minuto, nas condições de ensaio (Cavalcanti et al. 2005).

$$Atividade\,(U/g) = \frac{(V - Vb) \times M \times 1000}{t \times m}$$

(Eq. 1)

Onde:

V = volume de solução de NaOH gasto para a titulação da amostra (mL)

Vb = volume de solução de NaOH gasto para a titulação do branco (mL)

M = molaridade da solução de NaOH (mol/L)

t = tempo de reação (min)

m = massa do biocatalisador utilizado (g)

4.5. Reação de esterificação padrão

Nas reações de esterificação padrão foram empregados como substratos o ácido oleico (0,06 mols) e o etanol (0,06 mols). Como catalisador o PES seco (10% (m/m)) foi utilizado nas condições reacionais de temperatura igual à 40ºC, sob agitação magnética constante, por 24 horas. Foram retiradas alíquotas das reações no tempo 6h e no final da reação, 24h. Estas amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram pesados (100µL), em triplicata, e dissolvidos em 40mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v). A capacidade de conversão a ésteres etílicos foi determinada através de titulação automática (Mettler modelo DG20) dos ácidos graxos livres residuais com solução 0,04 mol.L de NaOH até o pH 11. O branco reacional foi obtido através da mistura dos substratos ácido oleico e o etanol, sem a adição da enzima. O valor da acidez das amostras foi calculado de acordo com a Equação 2 e a conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos foi calculada a partir da Equação 3 (AGUIEIRAS et al., 2014).

$$Acidez\ (\%m/m) = \frac{V \times M \times AG}{10 \times m} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

Onde:

V = volume da solução de NaOH consumida na titulação (mL)

M = concentração da solução de NaOH (mol.L^{-1})

AG = massa molar do ácido oleico (g)

m = massa da amostra (g).

$$Conversão(\%) = \frac{(Acidez_{inicial} - Acidez_{final}) \times 100}{Acidez_{inicial}} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Onde, a acidez inicial corresponde a acidez do branco reacional e a acidez final corresponde a acidez das amostra retiradas em cada tempo (6h e 24h).

4.6. Reação de esterificação *one-pot*

Reações de esterificação foram conduzidas em biorreator de leito fixo com 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro. Foram empregados como substratos o ácido oleico (0,06 mols) e o etanol (0,06 mols). O solido fermentado seco por aeração forçada e mantido no biorreator após a fermentação foi utilizado como biocatalisador (10% massa por volume de ácido oleico) nas condições reacionais de temperatura igual à 40ºC. O meio reacional (ácido oleico e etanol) foi mantido em um reservatório, sob agitação magnética constante e uma bomba peristáltica foi utilizada para bombear este meio para a coluna de leito fixo, onde se encontrava o biocatalisador. As vazões utilizadas na bomba peristáltica foram avaliadas em diferentes faixas de 3 mL/min à 22 mL/min. Alíquotas das reações foram retiradas da saída do biorreator em diferentes intervalos de tempo, até o tempo de 24h. Estas amostras não foram centrifugadas, pois o produto obtido não continha a enzima, visto que estas ficavam retidas dentro do biorreator de leito fixo.

Para analisar a capacidade de conversão a ésteres etílicos, foi utilizado o mesmo protocolo de titulação de ácidos graxos residuais descrito no tópico 4.5.

4.7. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade da amostra fermentada foi determinado por meio da análise de aproximadamente 1,0 g do sólido em balança determinadora de umidade SHIMADZU MX50, à 105 ºC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo

Esta etapa do trabalho visou estabelecer as condições de fermentação para a obtenção do sólido fermentado contendo lipase de *Rhizomucor miehei*, o qual será avaliado como biocatalisador em reação de esterificação em leito fixo na etapa seguinte.

A FES em biorreator de leito fixo do *Rhizomucor miehei* utilizando como meio de cultivo a torta de babaçu foi realizada inicialmente com as condições de fermentação descritas para a obtenção do sólido fermentado com o mesmo micro-organismo e a mesma torta em biorreator do tipo bandeja (AGUIEIRAS et al., 2014): 30ºC, 65% de umidade inicial da torta e 72h de fermentação. Para a aeração do biorreator de leito fixo foi empregada a vazão de ar descrita para a produção de lipase de outro fungo (*Penicillium simplicissimum*) também em torta de babaçu (CAVALCANTI et al., 2005): 0,8 L/min. Para esta condição de fermentação, nos tempos de 72 e 96h, foi observado o crescimento uniforme do fungo ao longo de todo o leito, porém com baixa densidade celular (Figura 5.1). A torta fermentada foi inteiramente retirada da coluna, misturada e liofilizada, para ter a sua capacidade catalítica avaliada. Os resultados da atividade hidrolítica (Figura 5.5) e da capacidade de síntese (Figura 5.6) do PES produzido a 30ºC mostraram que mesmo com baixo crescimento celular, o fungo foi capaz de produzir lipases em quantidade significativa, gerando 34 U/g de hidrólise e 81% de esterificação (para 96h de fermentação).

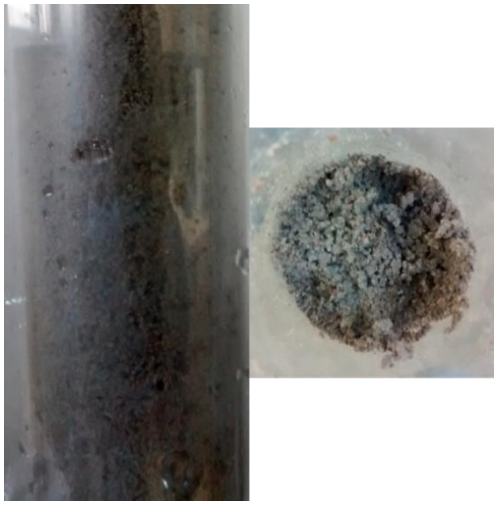

Figura 5.1: FES em leito fixo à 30°C, com vazão de ar igual a 0,8 L/min, 96h.

Uma vez que o crescimento celular a 30ºC foi baixo e uma maior biomassa poderia levar a uma maior produção de lipase, buscou-se aumentar o crescimento celular obtido na FES. O fungo filamentoso *Rhizomucor miehei* é termofílico, sua germinação e seu crescimento vegetativo ocorrem de forma ótima em altas temperaturas. Com isto, espera-se que este fungo seja capaz de metabolizar e consequentemente produzir enzimas em elevadas temperaturas (SILVA, 2014). SILVA (2014) estudou a produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator do tipo bandeja utilizando o fungo filamento *Rhizomucor miehei* e mostrou em seu trabalho que a produção de enzima está associada ao crescimento microbiano e que o aumento da temperatura favorece o crescimento do fungo *R. miehei*. Foi demonstrado também que com aumento da temperatura da fermentação ocorreu uma antecipação do tempo ótimo de produção da lipase de *R. miehei*, de 72 horas a 30°C para 48 horas a 35 e 40°C. O autor observou que o *R. miehei* apresentou alta taxa de produção de lipase e melhor crescimento em torta de babaçu quando fermentado à 40ºC.. Portanto, visando maximizar a produção de lipase e o crescimento de *R. miehei* no presente trabalho, foi realizada uma nova fermentação em leito fixo alterando a temperatura para 40ºC e reduzindo o tempo de fermentação para 48h.

Ao final da FES conduzida à 40ºC, foi observado que o fungo *R. miehei* cresceu mais do que na FES conduzida à 30ºC, porém somente na parte superior da coluna, e houve uma excessiva perda de umidade ao longo do leito (Figura 5.2). A parte do leito na qual houve crescimento do *R. miehei* foi utilizada como biocatalisador e apresentou atividade hidrolítica (Figura 5.5) e capacidade de esterificação (Figura 5.6) significativas: 19,4 U/g; em 6h 21,8% de conversão e em 24h 78,5% de conversão.

Figura 5.2: FES em leito fixo à 40°C com vazão de 0,8 L/min, 48h.

O acúmulo de calor em fermentações em estado sólido pode afetar diretamente a atividade enzimática, devido à desnaturação da enzima. Com isso, ao empregar biorreatores de leito fixo, a injeção de ar ao longo do leito contribui diretamente para a remoção do calor produzido durante o processo de fermentação preservando a produção enzimática. (GHILDYAL et al., 1994). GHILDYAL et al. (1994) descrevem a produção de proteases por fermentação em estado sólido utilizando um biorreator de leito fixo e correlacionam a produção enzimática com o calor produzido no leito e as vazões de ar utilizadas. Os autores observaram que a vazão de ar removeu o calor do leito e promoveu uma maior formação do produto ao elevar a vazão de 5 para 15 L/min, porém ao elevar a vazão para 25 L/min a mesma promoveu ressecamento do meio sólido de cultivo e não ocorreu aumento significativo de atividade enzimática em relação à vazão de ar de 15 L/min.

Portanto, na FES conduzida a 40ºC no presente trabalho, pode ser possível que a alta temperatura empregada combinada com a alta vazão de ar tenha contribuído para obtenção de baixa umidade no leito e consequente ausência de crescimento do micro-

organismo em grande parte do mesmo. Assim, foi avaliada a FES à 35ºC (visto que o melhor crescimento ocorre em temperaturas acima de 30ºC) em duas vazões de ar, 0,3 L/min e 0,5 L/min, por 48h (Figuras 5.3 e 5.4). A FES conduzida à 35ºC apresentou melhor crescimento microbiano (observado a olho nu) ao longo do leito quando foi empregada a vazão de ar de 0,3 L/min. Da mesma forma, a atividade hidrolítica (28 U/g - Figura 5.5) e a capacidade de esterificação (67 % em 6h de reação - Figura 5.6) foram maiores para as fermentações conduzidas à 35ºC e vazão de ar igual a 0,3 L/min. Com isso, a FES realizada à 35ºC, com vazão de ar de 0,3 L/min, foi selecionada como condição de fermentação para a produção de lipase com capacidade de síntese pelo fungo *R. miehei*, em torta de babaçu e biorreator de leito fixo. Esse sólido fermentado (biocatalisador) se mostrou inclusive superior ao produzido em biorreator do tipo bandeja, que atingiu 40% de conversão em 8h de reação de esterificação com sólido fermentado por 72h (AGUIEIRAS et al., 2014). O melhor resultado obtido com o biorreator do tipo leito fixo em relação ao do tipo bandeja pode ser explicado pelo maior controle da temperatura, umidade e oxigenação, favorecendo a colonização e produção de lipase de forma homogênea ao longo de toda a torta de babaçu.

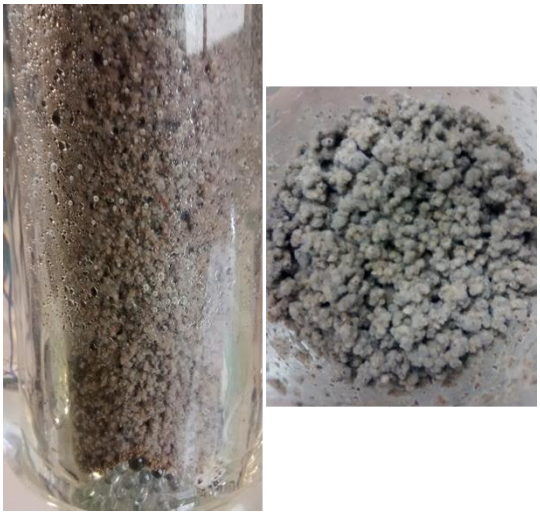

Figura 5.3: FES em leito fixo à 35°C com vazão de ar igual a 0,3 L/min, 48h.

Figura 5.4: FES em leito fixo à 35°C com vazão de ar igual à 0,5 L/min, 48h.

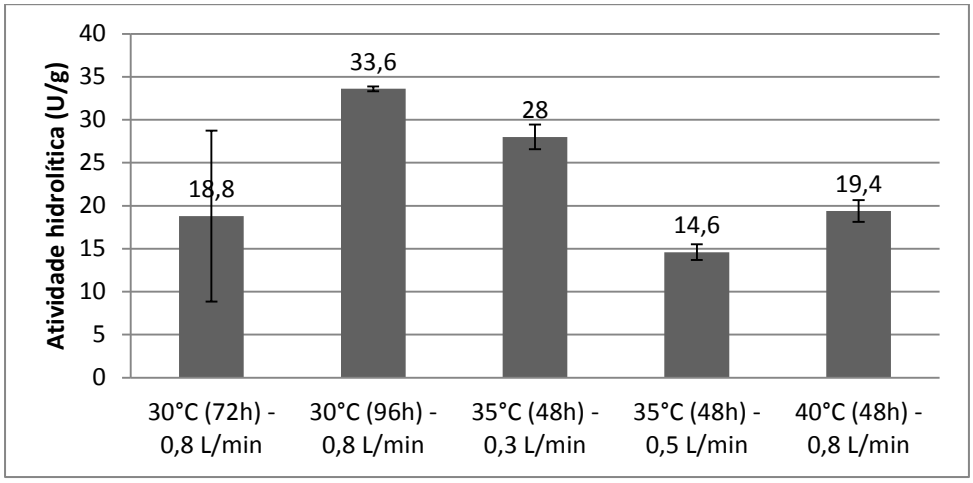

Figura 5.5: Ativiade hidrolítica das fermentações nas temperaturas de 30°C com vazão de 0,8 L/min, 35°C com vazões de 0,3 L/min e 0,5 L/min e 40°C com vazão de 0,8 L/min.

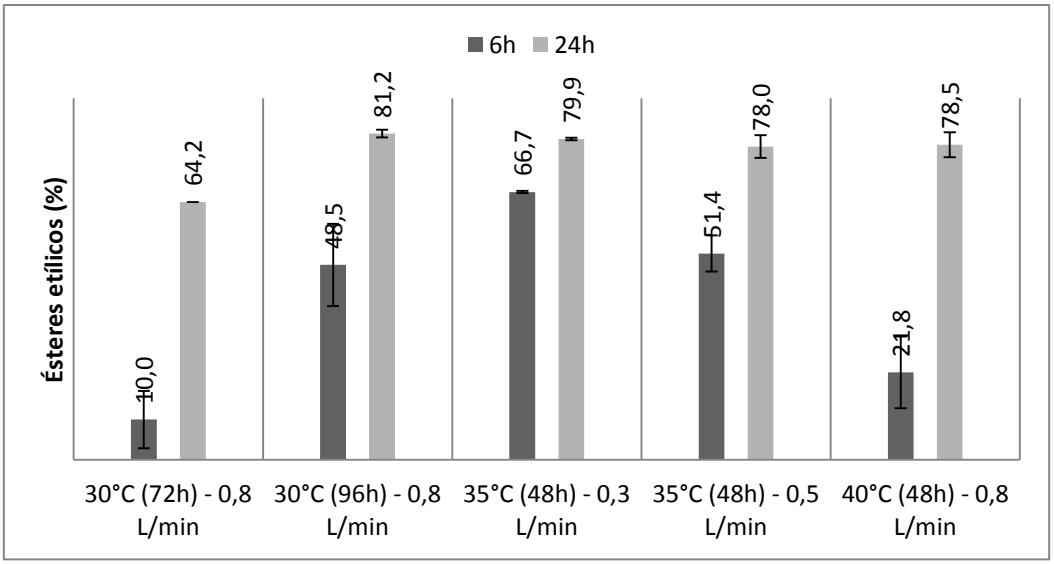

Figura 5.6: Capacidade de esterificação da lipase produzida por *R. miehei* nas temperaturas de 30°C com vazão de 0,8 L/min, 35°C com vazões de 0,3 L/min e 0,5 L/min e 40°C com vazão de 0,8 L/min.

A partir das condições de fermentação definidas acima, foi realizada uma cinética da FES no biorreator de leito fixo para encontrar o melhor tempo de fermentação (aquele com a maior conversão da reação de esterificação).

5.1.1. Cinética da FES em biorreator de leito fixo

Como observado nas fermentações anteriores, existe uma diferença no crescimento do micro-organismo e na produção de lipase de acordo com a altura do biorreator de leito fixo. O mesmo foi observado por CASTRO et al.(2015), que realizou o monitoramento da produção de hidrolases em três diferentes alturas do biorreator de leito fixo e observou que havia diferença significativa na produção enzimática nos diferentes pontos analisados. Por isso, nesta etapa do trabalho, ao realizar a cinética da fermentação, foram analisados os perfis de produção de lipase de *R. miehei* em diferentes alturas do leito fixo: topo, meio e base.

O resultado da atividade hidrolítica dos PESs produzidos (Figura 5.7) mostrou que as amostras fermentadas no tempo de 48h atingiram o máximo de atividade e que, após esse período, esta estabilizou. Não foi observada diferença de atividade hidrolítica nas diferentes alturas do biorreator de leito fixo.

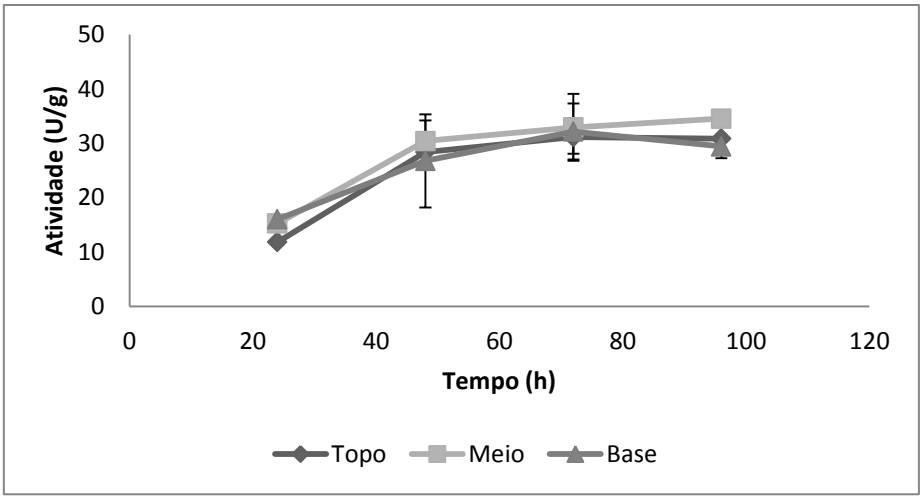

Figura 5.7: Cinética da atividade hidrolítica da FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min, nas três alturas da coluna – Topo, Meio e Base.

O pool enzimático produzido pelo fungo *R. miehei* também foi avaliado quanto à sua capacidade de síntese. Foram realizadas reações de esterificação padrão catalisadas pelo PES e o teor dos ésteres etílicos produzidos foi avaliado nos tempos de 6h (Figura 5.8) e 24h (Figura 5.9) de reação, para toda a cinética fermentativa e as diferentes alturas do leito fixo.

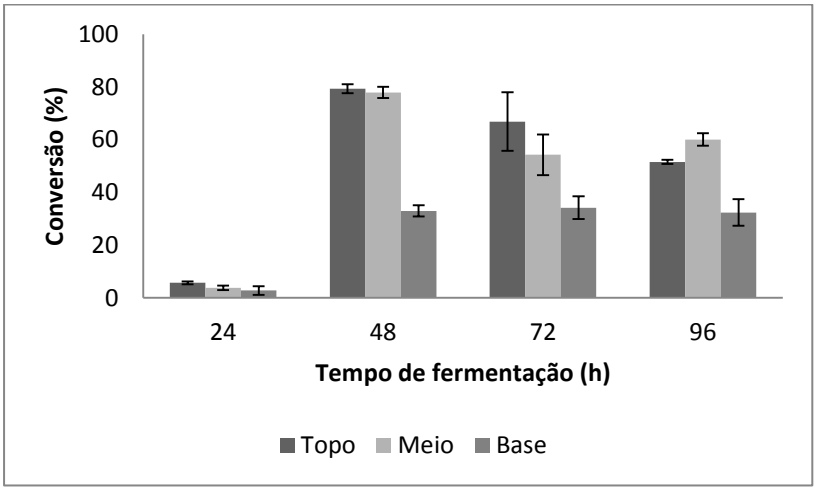

Figura 5.8: Produção de lipase com capacidade de síntese por FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min. Tempo de reação de esterificação de 6h, avaliando três alturas da coluna de leito fixo - Topo, Meio e Base.

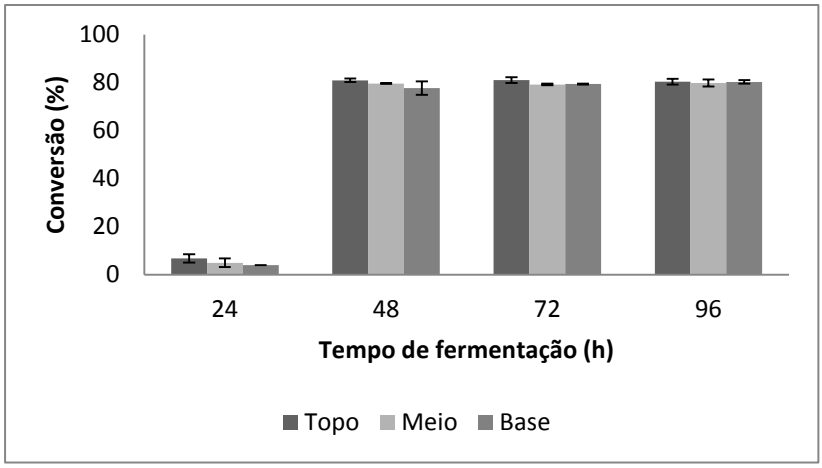

Figura 5.9: : Produção de lipase com capacidade de síntese por FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min. Tempo de reação de esterificação de 24h, avaliando três alturas da coluna de leito fixo - Topo, Meio e Base.

No tempo de 6h de reação (Figura 5.8), a conversão máxima obtida foi de 80%, para as amostras de topo e meio do biorreator da fermentação de 48h. Este resultado apresentou-se promissor quando comparado ao trabalho de AGUIEIRAS et al. (2014), que utiliza como biocatalisador para síntese de biodiesel PES de babaçu com *Rhizomucor miehei* fermentado em biorreator do tipo bandeja que apresenta o máximo de produção de ésteres etílicos por reação de esterificação igual a 40% em 8h de reação.

No tempo de reação de esterificação de 6 h (Figura 5.8), foi possível observar diferença na produção de lipase com capacidade de síntese nas diferentes alturas do biorreator. Na amostra fermentada em 48h, o topo e o meio do biorreator atingiram os 80% de conversão, enquanto a amostra referente à base do biorreator atingiu o máximo de 40% de conversão. Para os outros tempos de fermentação, as amostras referentes à base também apresentaram resultado inferior quando comparado às amostras do topo e do meio. Isto provavelmente ocorreu devido à diferença de umidade observada nas diferentes alturas do leito, onde a base ficou mais ressecada (23,39% de umidade) do que o topo (62,49% de umidade), com isso o crescimento do micro-organismo e a produção enzimática ocorreu melhor na região do leito fixo com maior quantidade de água. Portanto, a diferença de umidade não afetou a atividade hidrolítica nas diferentes alturas do leito, provavelmente porque a produção de lipase de *R. miehei* especifica para hidrólise não foi influenciada por este fator.

No tempo de 24h de reação (Figura 5.9), foi observado que na amostra fermentada à 48h, todas as alturas do leito – topo, meio e base – atingiram o máximo de

conversão de 80% que se manteve até a fermentação de 96h, nos mostrando que o máximo de conversão deste novo biocatalisador, sem otimização da reação de esterificação foi de 80% de conversão à ésteres etílicos (provável equilíbrio da reação).

5.2. Secagem por aeração forçada em biorreator de leito fixo

A secagem do material fermentado é necessária tanto para aumentar o seu tempo de prateleira quanto para o seu uso como biocatalisador de reações de esterificação (uma vez que a água é o produto da reação de esterificação essa pode funcionar como inibidor competitivo da reação). A secagem dos sólidos fermentados por liofilização é bem conhecida (AGUIEIRAS et al. 2014; ÁVILA, 2015), mas este processo apresenta um alto custo. Portanto, visando a redução do custo e a obtenção de um processo de secagem na qual fosse preservada a estrutura do sólido fermentado dentro do biorreator de leito fixo, para a realização do sistema de reação integrado (*one-pot)*, foi avaliado, como processo alternativo de secagem, a aeração forçada do leito fixo, empregando injeção de ar.

Como o foco deste trabalho foi obter um PES capaz de realizar processos de sínteses por reação de esterificação, o sólido fermentado seco por aeração forçada foi avaliado quanto à produção de lipase com capacidade de esterificação, por meio de uma reação padrão de esterificação onde amostras foram retiradas nos tempos de 6h e 24h de reação (Figura 5.10 e 5.11). Foram testados dois tempos de secagem, 24h e 48h, utilizado a vazão de ar de 1,0 L/min.

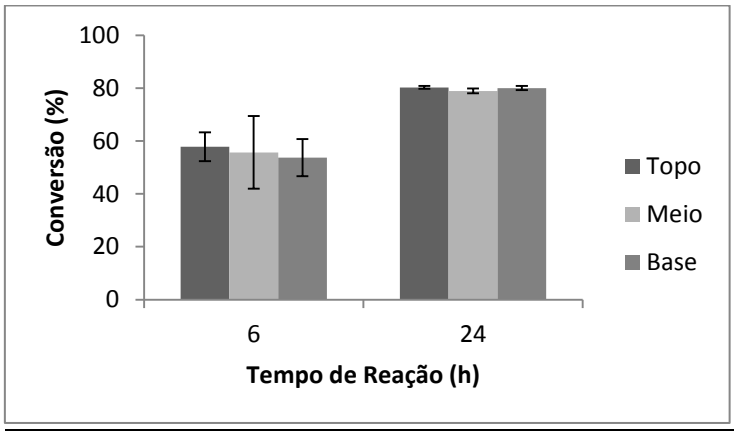

Figura 5.10: Reação de esterificação de PES seco por sistema de aeração forçada em 24h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base.

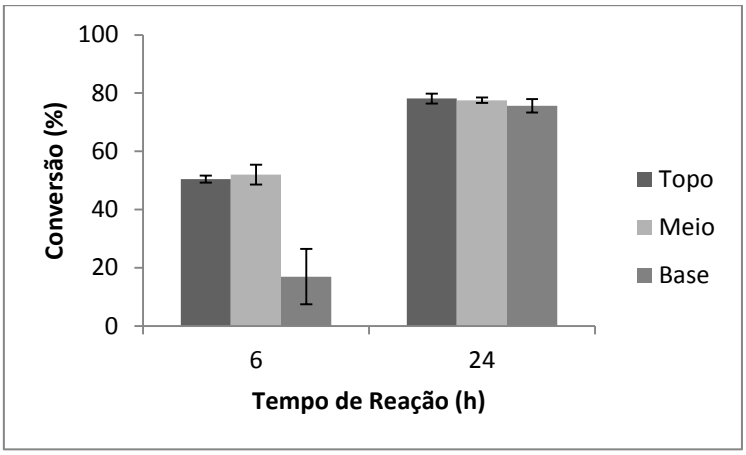

Figura 5.11: Reação de esterificação de PES seco por sistema de aeração forçada em 48h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base.

Como controle, foi realizada a secagem do PES pelo método de liofilização em 48h, e este PES seco foi colocado em mesmo sistema de reação padrão de esterificação com amostras retiradas no tempo de 6h e 24h. O método de secagem por aeração forçada se mostrou mais favorável que a liofilização, pois a produção de lipase com capacidade de síntese por esterificação, para os dois tempos de secagem (24h e 48h), apresentou cerca de 50% de conversão a ésteres etílicos em 6h de reação, e 80% de conversão à ésteres etílicos em 24h de reação. Enquanto que no controle foram obtidos apenas 38,8% de conversão em 6h de reação e 80,3% de conversão em 24h de reação.

Além da produção de lipase com capacidade de esterificação, outro parâmetro avaliado foi a umidade final após cada tempo de secagem estudado. As lipases, na presença de água podem direcionar a reação para uma hidrólise, como a reações de interesse desde trabalho são as reações de esterificação e transesterificação, que exige pouca ou nenhuma quantidade de água no meio reacional (FREIRE E CASTILHO 2008).

Ao analisar o teor de umidade final dos PES secos por aeração forçada, nos tempos de secagem de 24h e 48h, o PES seco por 48h apresentou umidade inferior: 5% de umidade nas três diferentes alturas do leito fixo (Figura 5.12).

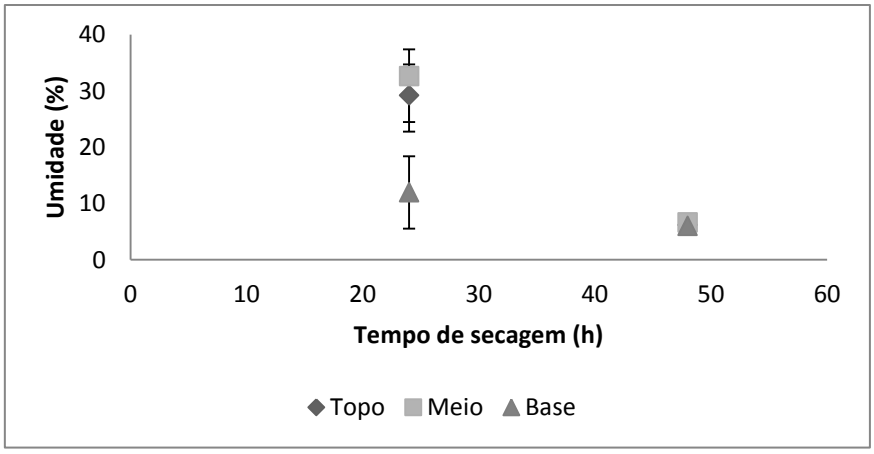

Figura 5.12: Umidade do PES seco por sistema de aeração forçada nos tempos de 24 e 48h com vazão de ar igual a 1,0 L/min nas diferentes alturas do leito fixo – Topo, Meio e Base

SOARES et al. (2013) avaliou três processos de secagem diferentes do sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* LTEB11, a fim de reduzir os custos, visto que o processo mais utilizado – liofilização - é muito caro. Os processos avaliados foram liofilização, secagem em coluna de vidro com aeração forçada e estufa de ar forçado. A aeração forçada em coluna de vidro foi a selecionada neste trabalho visto que manteve 100% da atividade do sólido fermentado se igualando ao processo comumente utilizado de liofilização. Com isto, tal tecnologia se apresenta promissora para ser aplicado neste trabalho.

Com isso, o tempo de 48h de secagem foi selecionado para a obtenção do biocatalisador seco por aeração forçada.

A viabilidade do biocatalisador produzido e seco por aeração forçada foi avaliada após armazenamento na geladeira (4ºC) e na prateleira (25ºC) por 90 dias. Foi observado que dentro do tempo avaliado não houve queda na capacidade de esterificação deste biocatalisador nas reações de esterificação realizadas em 6h (Figura 5.13) e em 24h (Figura 5.14).

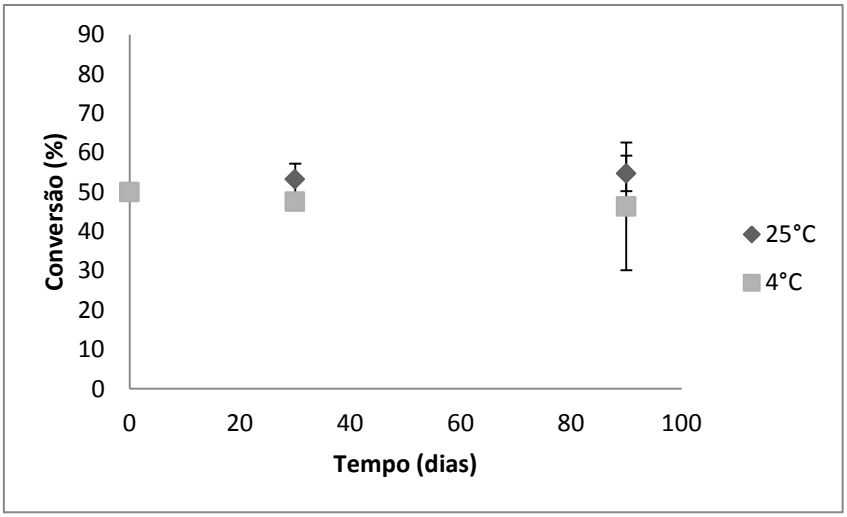

Figura 5.13: Viabilidade do PES produzido em biorreator de leito fixo e seco por aeração forçada armazenado à 4°C (■) e a 25°C (♦). Reação de esterificação feita em 6h.

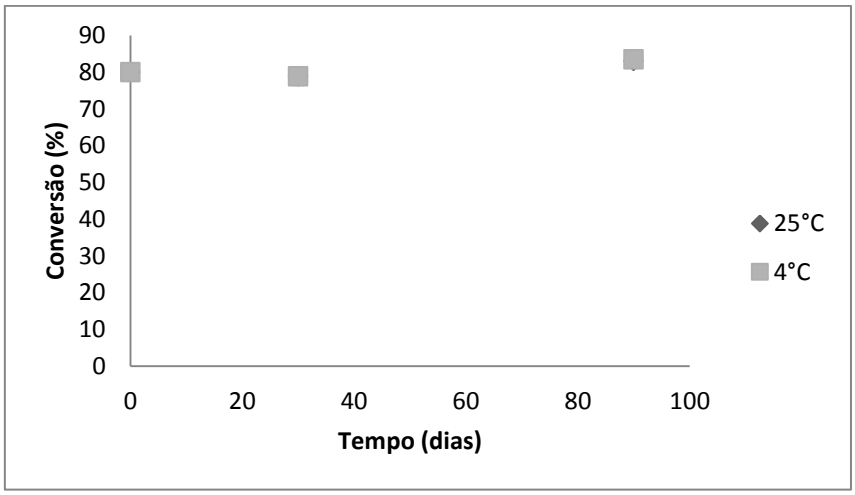

Figura 5.14: Viabilidade do PES produzido em biorreator de leito fixo e seco por aeração forçada armazenado à 4°C (■) e a 25°C (♦). Reação de esterificação feita em 24h.

5.3. Reação de esterificação em sistema integrado (*one-pot*)

Na literatura, a maioria das reações enzimáticas em biorreator de leito fixo utiliza lipases comerciais imobilizadas em suportes porosos (SAHIN et al., 2012; CHEN et al., 2009; HAMA et al., 2011). Porém, a utilização de sólido fermentado como biocatalisador apresenta como vantagem o seu baixo custo (SALUM et al., 2010). Poucos são os trabalhos que utilizam como biocatalisadores sólidos fermentados nas reações realizadas em biorreator de leito fixo. Todos os trabalhos até agora observados nesta linha foram do mesmo grupo de pesquisa (SALUM et al. 2010; SOARES et al. 2013; SOARES et al. 2015). Nesses trabalhos, o meio de cultivo sólido utilizado para a produção do biocatalisador, o farelo de semente de girassol, ao ser colocado no leito

fixo não apresentava poros suficientes para seguir um processo reacional, podendo assim gerar o empacotamento do leito. Como solução, foi misturado a este meio de cultivo sólido bagaço de cana de açúcar para conferir volume e estrutura ao leito e evitar o empacotamento (SALUM et al., 2010). Porém, o processo fermentativo foi realizado em uma etapa anterior ao processo de reação, utilizando biorreatores do tipo bandeja, o que difere da proposta inicial deste trabalho de utilizar o biorreator de leito fixo nos dois processos de forma integrada, produção da enzima por fermentação em estado sólido e reações de síntese.

Uma as vantagens desse sistema de reação em biorreator de leito fixo é a alta conversão obtida devido o elevado tempo de contato entre o substrato e o biocatalisador. A vazão reacional e o volume do reator são parâmetros importantes, pois irão determinar o tempo de reação e o tempo de contato do substrato com a enzima. Portanto, a vazão reacional é um parâmetro que deve ser otimizado para promover o maior contato entre substrato e enzima, favorecendo melhores conversões (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA, E FREIRE, 2015).

Neste trabalho, três diferentes vazões da reação foram avaliadas: 3 mL/min, 12 mL/min e 22 mL/min, e foi observado que a vazão de 12 mL/min para este sistema de reação *one-pot* foi o melhor empregado, visto que em 22h a reação começou a estabilizar em um valor maior (57%) do que o obtido nas outras vazões testadas (Figura 5.15).

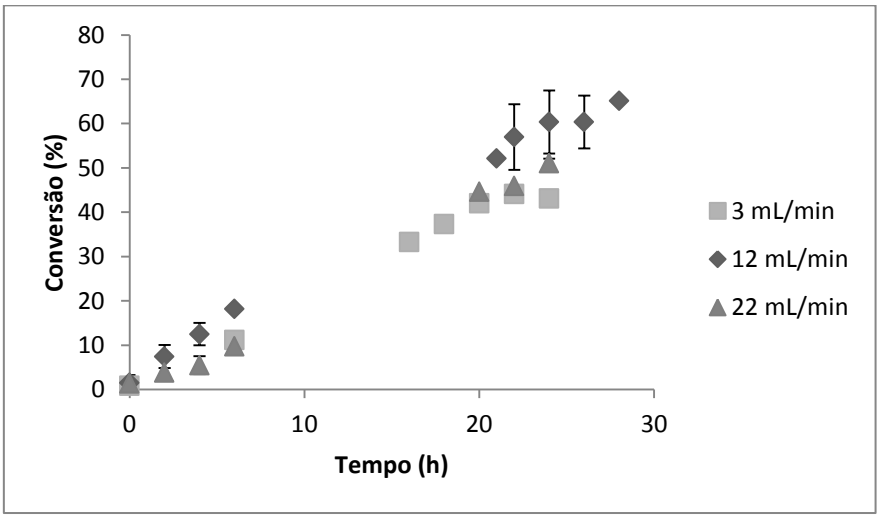

Figura 5.15: Reação de estertificação no sistema one-pot em três diferentes vazões - 3 mL/min (■), 12 mL/min (♦) e 22 mL/min (▲).

TRAN et al. (2016), avaliaram em seu trabalho a produção de biodiesel em biorreator de leito fixo em diferentes alturas do leito, e descreve que a variação na taxa de vazão da reação modifica diretamente a produção de biodiesel. Conforme ocorre o aumento da vazão, tanto para reação realizada em uma única coluna como para reação realizada em sistema continuo de biorreator de leito fixo (serie de três colunas), melhor é a taxa de conversão a biodiesel. (HAMA et al., 2007) observaram que nas vazões estudadas, (5, 25 e 55 L/h), o aumento da vazão da reação, aumentou a conversão em ésteres metílicos obtidos, sendo assim a vazão de 55 L/h a melhor descrita. Nesta vazão a taxa reacional permaneceu a mesma após 5 reusos, porém, o peso celular avaliado após o quinto reuso mostrou que a alta vazão empregada acelerou o grau de esfoliação das células de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em BSPs. Este fato indica que possivelmente o dano físico ao biocatalisador pode influenciar a estabilidade e a atividade enzimática. Ao contrario de TRAN et al. (2016) e HAMA et al. (2007), a maior vazão utilizada neste caso não favoreceu o aumento da conversão, provavelmente porque a maior vazão testada tenha gerado danos ao biocatalisador na configuração do biorreator utilizado neste trabalho. Com isto, a vazão de 12 mL/min, foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho.

Como já foi discorrido neste trabalho, nas reações até agora realizadas de síntese em biorreatores de leito fixo com sólido fermentado como biocatalisador o PES é produzido separadamente em outro tipo de biorreator e após é colocado no biorreator de leito fixo onde será realizada a reação (SALUM et al., 2010). Neste processo descrito, ao manipular o PES as estruturas de interação fungo-torta são desfeitas e a granulometria do mesmo é diminuída, compactando o biocatalisador no leito. Portanto, para mimetizar tal processo, o PES fermentado e seco na coluna de leito fixo foi retirado desta coluna, fragmentado, desfazendo a interação fungo-torta, e recolocado nesta mesma coluna para prosseguir com a reação de esterificação em leito fixo. A reação foi realizada nas mesmas condições descritas para o sistema *one-pot* e na vazão da bomba peristáltica estabelecida acima (12 mL/min). O resultado foi comparado com a reação de esterificação em sistema *one-pot* que apresentou melhor vazão (12 mL/min) e como controle deste biocatalisador foi feito uma reação de esterificação padrão em biorreator agitado. Os resultados dessas reações podem ser observados no gráfico abaixo (Figura 5.16).

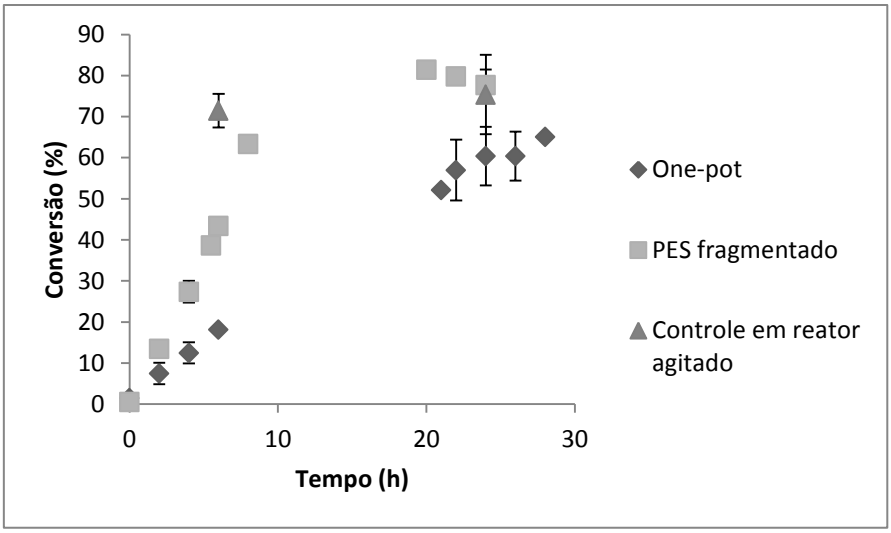

Figura 5.16: Reação de esterificação na coluna no sistema one-pot (♦), com o PES fragmentado e recolocado no biorreator (■) e controle realizado em reator agitado (▲).

Na reação em leito fixo realizada com o PES fragmentado, a produtividade foi maior quando comparada com o sistema *one-pot*, quase se igualando ao controle realizado em biorreator agitado. Em 8h de reação com o PES fragmentado foi obtido cerca de 63,3% de conversão a ésteres etílicos, bem próximo aos 71,4% obtido pelo controle em 6h de reação. Este PES fragmentado atingiu ainda cerca de 81,4% de conversão em 20h de reação, se estabilizando até o tempo de 24h. Tal resultado foi maior do que o obtido pelo sistema *one-pot* (máximo foi de 65,1% em 28h) e pelo próprio controle (75,4% em 24h).

Foi observado que, após o processo de secagem por aeração forçada do sólido fermentado no biorreator de leito fixo, a torta de babaçu fermentada sofreu encolhimento reduzindo o diâmetro do leito em aproximadamente 1,0 cm (Figura 5.17), se desgrudando da coluna e favorecendo a criação de caminho preferencial quando realizada a reação *one-pot*. A formação do caminho preferencial pode ter contribuído para a baixa conversão obtida por este sistema. Portanto, ao ser realizado o processo de retirada e recolocação do PES fragmentado na coluna, tal caminho preferencial foi desfeito, aumentando a conversão obtida por este biocatalisador ao ser realizado a reação de esterificação em leito fixo.

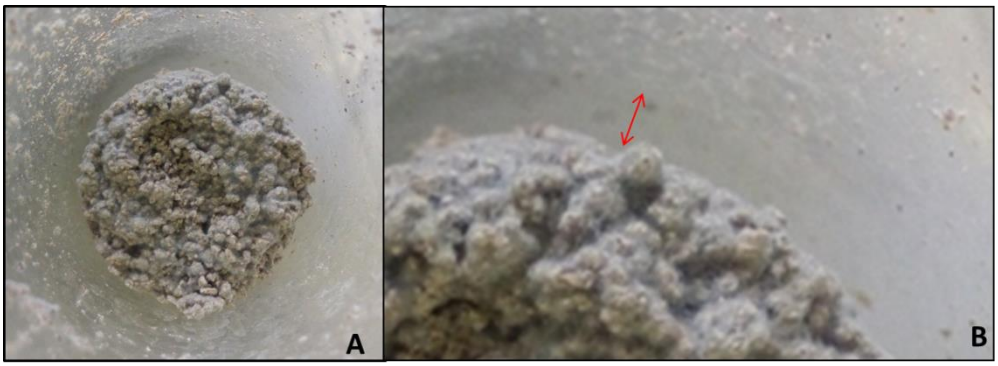

Figura 5.17: Sólido fermentado e seco na coluna de leito fixo (A). Detalhe do encolhimento do sólido fermentado após processo de secagem (B).

Como solução para este problema, foi realizada uma nova fermentação em estado sólido no biorreator de leito fixo, na mesma condição já estabelecida para a torta de babaçu pura, com o mesmo misturado com fibra da polpa de dendê. A fibra foi usada como agente estruturante a fim dar volume e estrutura ao sólido fermentado no leito fixo após o processo de secagem por aeração forçada e com isto, evitar a redução do leito e consequente geração de caminhos preferenciais durante o processo de reação.

A fibra de dendê foi testada em duas granulometrias diferentes (em < 2.8 mm e *in natura*) e em duas proporções diferentes na torta de babaçu (20 e 40 %m/m) e analisadas inicialmente por reação de esterificação padrão em reator agitado. Para comparação, foi feito um controle com PES somente de babaçu (Figura 5.18).

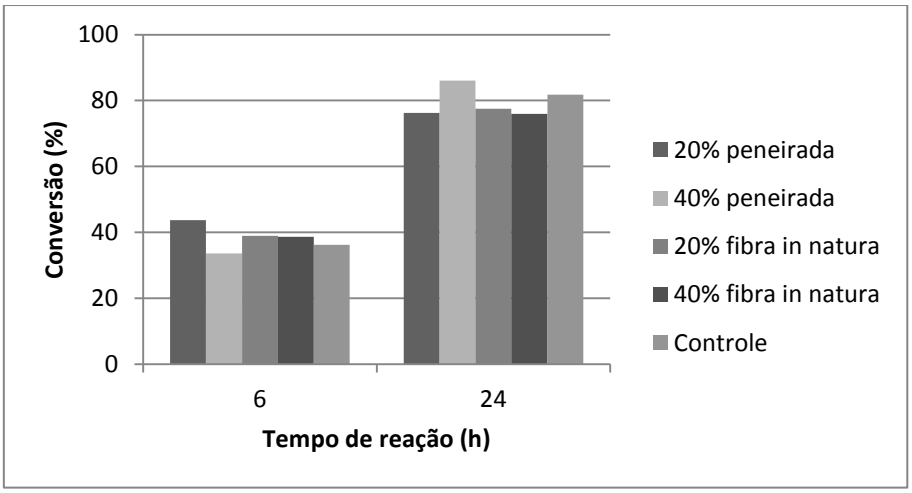

Figura 5.18: Reação de esterificação padrão em reator agitado realizada utilizado o PES com babaçu e fibra de dendê em diferentes granulometrias (peneirada < 2.8 e *in natura*) e porcentagens (20% e 40%), e controle realizado com PES somente com babaçu nos tempos de 6h e 24h de reação.

O biocatalisador produzido a partir da mistura de babaçu e fibra de dendê se mostrou promissor, pois a capacidade de esterificação foi semelhante à obtida pelo biocatalisador composto somente de babaçu para os dois tempos de reação avaliados, 6h e 24h, e para todas as granulometrias da fibra de dendê e porcentagens empregadas. Ao analisar morfologicamente o sólido fermentado após secagem em leito fixo, foi observado que o PES com 40% de fibra de dendê *in natura* não sofreu encolhimento na sua estrutura, e não desgrudou da coluna. Na Figura 5.19, podemos observar as quatro condições de fermentação após a secagem e na Figura 5.20 podemos observar mais detalhadamente a formação de um caminho entre o sólido fermentado e a coluna nas fotos A, B e C (FES com 20% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm; FES com 40% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm; FES com 20% de fibra de dendê in natura, respectivamente) e a ausência deste caminho na foto D devido a utilização de 40% da fibra de dendê *in natura* que conferiu estrutura para este sólido fermentado.

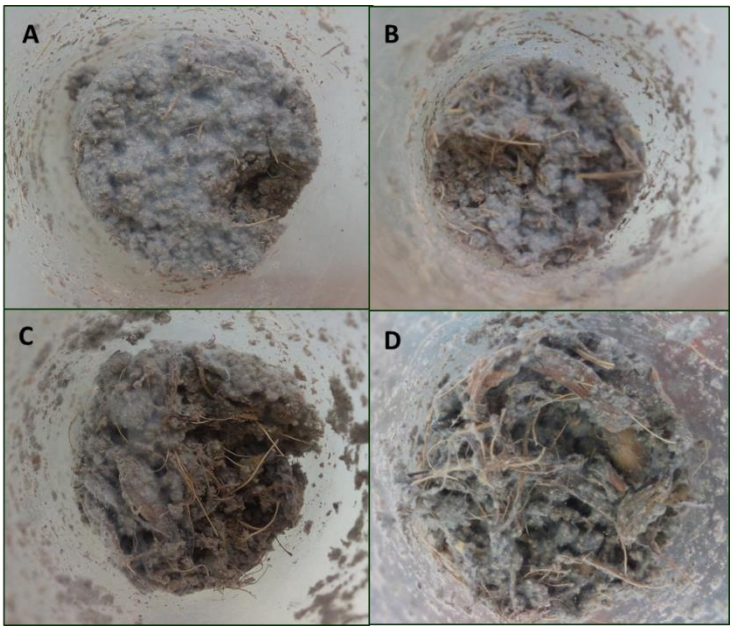

Figura 5.19: FES com 20% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (A); FES com 40% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (B); FES com 20% de fibra de dendê *in natura* (C); FES com 40% de fibra de dendê *in natura* (D).

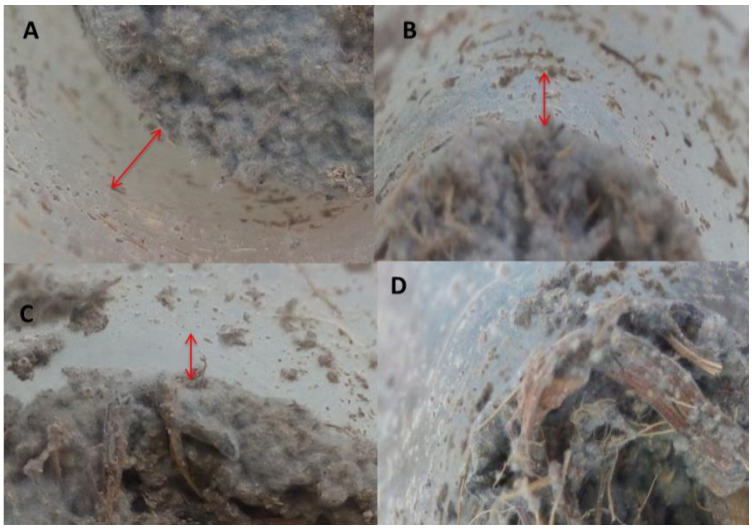

Figura 5.20: Detalhe do encolhimento das FES com 20% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (A); FES com 40% de fibra de dendê com granulometria inferior a 2.8 mm (B); FES com 20% de fibra de dendê *in natura* (C); FES com 40% de fibra de dendê *in natura* (D).

Na Figura 5.21, é possível observar que antes da secagem por aeração forçada do sólido fermentado com 40% da fibra de dendê *in natura* no leito fixo, a estrutura fungo-substrato se mantém, porém após o processo de secagem por aeração forçada (Figura 5.22) não se observa mais as hifas mantendo a estrutura. Com isto, podemos concluir que a secagem por aeração forçada favorece o encolhimento estrutural do leito e consequentemente a formação de caminhos preferenciais na reação.

Figura 5.21: Interação fungo-substrato na FES com 40% da fibra de dendê *in natura* antes do processo de secagem por aeração forçada.

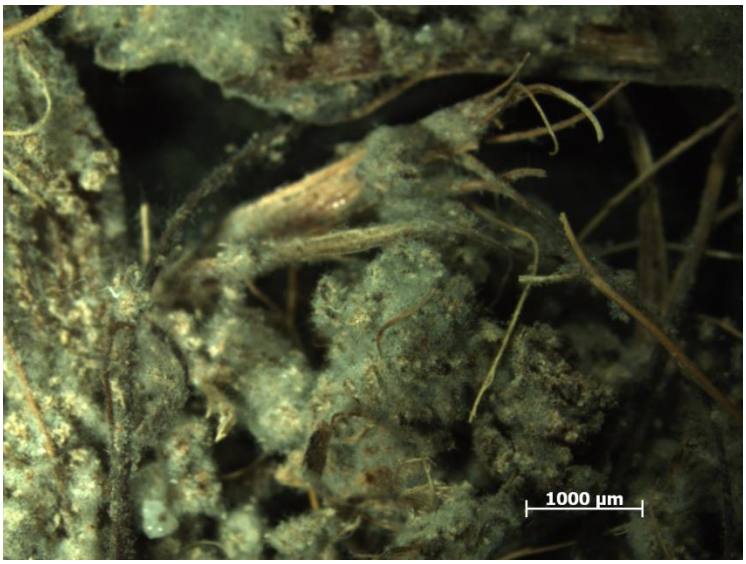

Figura 5.22:Interação fungo-substrato na FES com 40% da fibra de dendê *in natura* após do processo de secagem por aeração forçada.

Após estabelecer a melhor proporção e granulometria de fibra de dendê a ser empregada no processo de fermentação, foi realizada a reação de esterificação *one-pot* com este sólido fermentado (Figura 5.23).

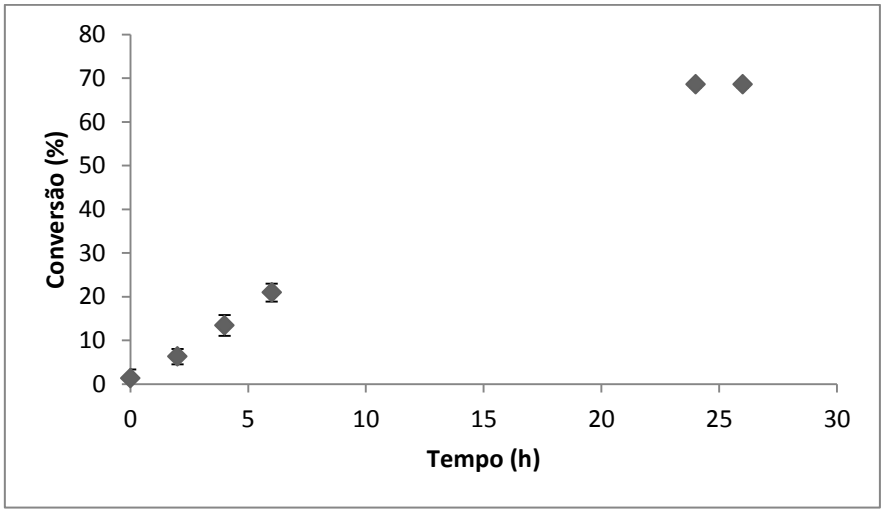

Figura 5.23: Reação de esterificação em leito fixo utilizando FES com 40% de fibra de dendê *in natura*.

Na reação de esterificação em leito fixo com o sólido fermentado com babaçu e fibra de dendê, foi obtido em 6h de reação cerca de 20,9% de ésteres etílico, e em 24h a reação chegou a 68,6% se estabilizando. Valores abaixo dos obtidos na reação em biorreator com sistema agitado nos tempos de 6h (38,7% de conversão) e 24h (76% de conversão) (Figura 5.23). O desempenho inferior obtido neste sistema pode ter sido causado , pela melhor transferência de massa que a agitação promove em reatores do

tipo tanque agitado. Uma maior homogeneidade do meio reacional deve ter levado a uma melhor eficiência da reação.

. TRAN et al., utilizaram para a produção de biodiesel uma sequência de três reatores, com remoção do glicerol produzido no primeiro reator utilizado. O biodiesel foi convertido à 85% ao utilizar biorreatores em serie, valor maior do que o obtido na reação com somente um reator (67% de conversão), devido ao acumulo de glicerol na reação.

Com isso, para promover o aumenta da conversão a ésteres etílicos no presente trabalho, foi realizado duas reações de esterificação consecutivas em biorreatores de leito fixo com o sistema *one-pot* (Figura 5.24).

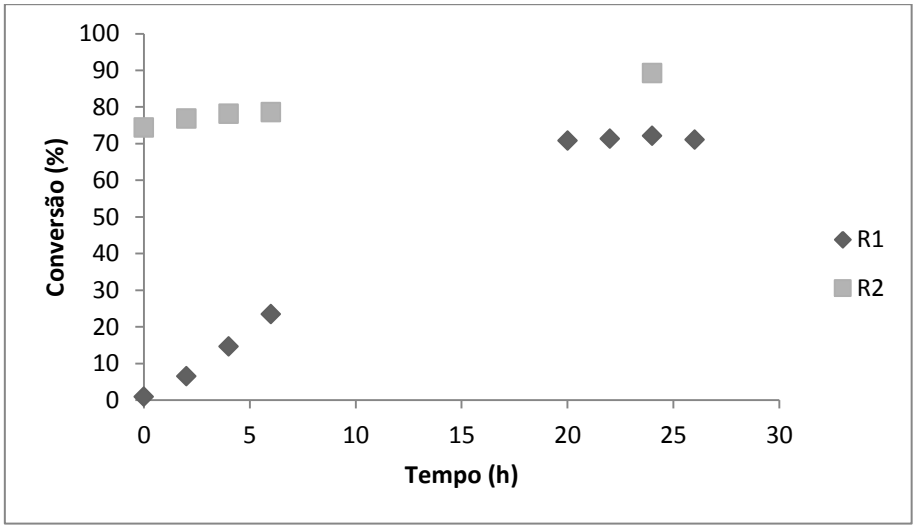

Figura 5.24: Reações consecutivas de esterificação na coluna com 40% da fibra de dendê *in natura* e babaçu.

A primeira reação (R1) foi realizada até o tempo de 26h onde a produção de ésteres etílicos foi estabilizada em 71,1% de conversão. Na segunda reação (R2), foi empregado um novo biorreator de leito fixo composto de um novo material fermentado e seco (biocatalisador) e prosseguiu por mais 24h. O obtido em R1 foi empregado como substrato de R2, portanto iniciando a reação R2 com 71,1% de ésteres etílicos em sua composição, assim, na reação R2 foi obtido em 6h de reação cerca de 78,6% de ésteres etílicos, e em 24h a conversão chegou a 89,2% de ésteres etílicos (Figura 5.24).

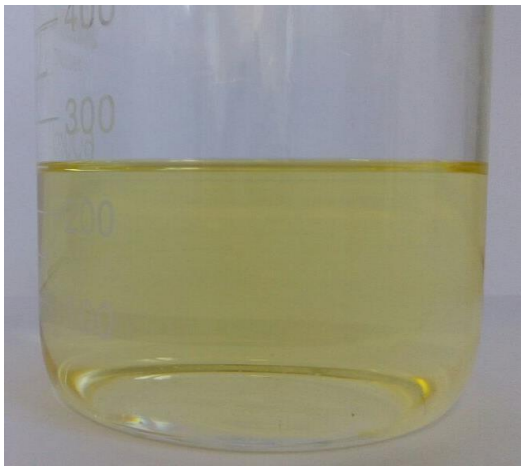

Figura 5.25: Produto final obtido após reação de esterificação em sistema one-pot sem processos de downstream.

Uma das vantagens de reações em biorreator de leito fixo é a facilidade de recuperar o biocatalisador utilizado (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA, E FREIRE, 2015). As etapas de downstream são muitas vezes necessárias em sistema reacionais para a purificação do produto final, porém tal procedimento encare o processo total (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Por meio desta metodologia de reação em sistema *one-pot*, etapas de dowstream não foram necessárias, pois a enzima permaneceu imobilizada na biomassa dentro do biorreator, e o produto final obtido apresentou o aspecto nítido, sem vestígios do biocatalisador em sua composição (Figura 5.25). Ao utilizar biorreatores agitado, depois de completar a reação, o produto final é obtido junto com o biocatalisador, portanto uma etapa extra de separação sólido-líquido para recuperação da enzima e do produto final por centrifugação se torna necessária (POPPE et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

A partir da tecnologia de baixo custo de FES, foi possível obter um biocatalisador com alto potencial biotecnológico para ser aplicado em biocatálise empregando um coproduto industrial como matéria- prima, em biorreator de leito fixo, com resultado superior à FES realizada em biorreator do tipo bandeja.

A metodologia de secagem por aeração forçada, implementada neste trabalho, se mostrou viável, podendo assim substituir processos de secagem mais caros, como a liofilização, sem perda da atividade enzimática do sólido fermentado.

O sistema proposto inicialmente, produção de lipase por fermentação em estado sólido integrado com aplicação em reações de biocatálise no biorreator de leito fixo, se mostrou viável de ser realizado sem que ocorresse o empacotamento do leito e abriu perspectivas para estudos futuros.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido ao potencial biotecnológico apresentado por este biocatalisador produzido por FES em biorreator de leito fixo se tornou interessante avaliar o potencial do biocatalisador em reator agitado e posteriormente no sistema integrado de leito fixo (*one-pot*) em outras reações de síntese como:

- Produção de biolubrificantes;
- Esterificação com destilado da desodorização do óleo de soja (co-produto da indústria de óleo de soja);
- Síntese de lipídeos estruturado;
- Transesterificação para síntese de biodiesel;
- Reações de hidrólises - Testar o biocatalisador úmido, com isto não necessitando da etapa de secagem no sistema.

Além disso, o potencial biotecnológico deste biocatalisador pode ser avaliado por meio de:

- Reações de reuso da coluna de leito fixo com o biocatalisador produzido;
- Otimizações das melhores reações;
- Aplicação de reações em etapas consecutivas com mais de um biorreator.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguieiras, E. C., Cavalcanti-Oliveira, E. D., de Castro, A. M., Langone, M. A., & Freire, D. M. (2014). Biodiesel production from Acrocomia aculeata acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. Fuel, 135, 315-321.

Aguieiras, E. C., Cavalcanti-Oliveira, E. D., & Freire, D. M. (2015). Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. Fuel, 159, 52-67.

Ávila, Sabrini Natali da Silva. (2015). Estudo da produção de lipases por fermentação no estado sólido visando a obtenção de biocatalisador de baixo custo para a síntese de biodiesel. Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Polo Xerém.

Benjamin, S., & Pandey, A. (1997). Coconut cake–a potent substrate for the production of lipase by Candida rugosa in solid-state fermentation. Acta Biotechnologica, 17(3), 241-251.

Castro, A. M., Castilho, L. R., & Freire, D. M. (2015). Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by Aspergillus awamori. Biochemical Engineering Journal, 93, 303-308.

Cavalcanti, E. D. A. C., Gutarra, M. L. E., Freire, D. M. G., Castilho, L. D. R., & Sant'Anna Júnior, G. L. (2005). Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(SPE), 79-84.

Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., & Wang, X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy conversion and management, 50(3), 668-673.

DESER – Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais. Secretaria da Agricultura Familiar. A cadeia produtiva do babaçu: Estudo exploratório. Curitiba. 2007.

Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B. C., & Bon, E. P. (2010). Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. Waste and Biomass Valorization, 1(1), 65-76.

Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnology and bioengineering, 102(5), 1298-1315.

Freire, D. M. G., & Castilho, L. D. R. (2008). Lipases em biocatálise. In: Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., CORVO, M. L., Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicação E Mercado, Ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 369–385.

Freire, D. M. G, Sousa, J. S., & Cavalcanti-Oliveira, E. D. (2011). Biotechnological methods to produce biodiesel. In: Pandey A., Larroche C., Ricke S.C, Dussap C-G., Gnansounou E., Biofuels, Ed. Academic Press, p. 315–337.

Fukuda, H., Kondo, A., & Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. Biochemical Engineering Journal, 44(1), 2-12.

Ghildyal, N. P., Gowthaman, M. K., Rao, K. R., & Karanth, N. G. (1994). Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. Enzyme and microbial technology, 16(3), 253-257.

Gutarra, M. L., Cavalcanti, E. D., Castilho, L. R., Freire, D. M., & Sant'Anna Jr, G. L. (2005). Lipase production by solid-state fermentation. In Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (pp. 105-116). Humana Press.

Gutarra, M. L., Godoy, M. G., Maugeri, F., Rodrigues, M. I., Freire, D. M., & Castilho, L. R. (2009). Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus Penicillium simplicissimum by solid-state fermentation. Bioresource technology, 100(21), 5249-5254.

Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., ... & Fukuda, H. (2007). Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. Biochemical Engineering Journal, 34(3), 273-278.

Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Tamadani, N., Kuratani, N., Noda, H., ... & Kondo, A. (2011). Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. Biochemical engineering journal, 55(1), 66-71.

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?. Current Opinion in Microbiology, 8(3), 301-306.

Imandi, S. B., Karanam, S. K., & Garapati, H. R. (2013). Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by Yarrowia lipolytica from mustard oil cake (Brassica napus). Brazilian Journal of Microbiology, 44(3), 915-921.

Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in biotechnology, 16(9), 396-403.

Knothe, G. (2006). Propriedades do Combustível. In: Knothe G., Krahl J., Gerpen J.V., Ramos L.P., Manual de Biodiesel, Ed. Blucher, São Paulo, p.83-180.

Kumar, D. S., & Ray, S. (2015). Fungal lipase production by solid state fermentation-an overview. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, 2015.

Liu, Y., Li, C., Meng, X., & Yan, Y. (2013). Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of Burkholderia cenocepacia via solid state fermentation. Fuel processing technology, 106, 303-309.

Mitchell, D. A., Krieger, N., Stuart, D. M., & Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochemistry, 35(10), 1211-1225.

Mitchell, D. A., Berovic, M., & Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology Annual Review, 8, 183-225.

Manoel, E. A., Pais, K. C., Cunha, A. G., Simas, A. B., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. (2012). Kinetic resolution of 1, 3, 6-tri-O-benzyl-myo-inositol by Novozym 435: Optimization and enzyme reuse. Organic Process Research & Development, 16(8), 1378-1384.

Manoel, E. A., Pais, K. C., Flores, M. C., e Miranda, L. S. D. M., Coelho, M. A. Z., Simas, A. B., ... & de Souza, R. O. M. (2013). Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 87, 139-143.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2), 81-84.

Paques, F. W., & Macedo, G. A. (2006). Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. Química nova, 29(1), 93.

Poppe, J. K., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. Z. (2015). Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. Biotechnology advances, 33(5), 511-525.

Ramos, L. P., Silva, F. R., Mangrich, A. S., & Cordeiro, C. S. (2011). Tecnologias de produção de biodiesel. Revista virtual de química, 3(5), 385-405.

Robinson, T., & Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2), 197-203.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. Biotechnology advances, 27(4), 398-408.

Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010a). Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66(1), 15-32.

Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010b). Lipase from Rhizomucor miehei as an industrial biocatalyst in chemical process. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 64(1), 1-22.

Sahin, S., Mäki-Arvela, P., Kangas, M., Eränen, K., Wärnnå, J., Salmi, T., & Murzin, D. Y. (2012). Lipase-catalyzed acylation in a continuous down-flow fixed-bed reactor. Kinetics and Catalysis, 53(6), 673-683.

Salum, T. F. C., Villeneuve, P., Barea, B., Yamamoto, C. I., Côcco, L. C., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2010). Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by Burkholderia cepacia LTEB11. Process Biochemistry, 45(8), 1348-1354.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44(1), 13-18.

Silva, Jaqueline do Nascimento. Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido Utilizando o Fungo Rhizomucor miehei. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Silva, M. F., Freire, D. M., de Castro, A. M., Di Luccio, M., Mazutti, M. A., Oliveira, J. V., ... & Oliveira, D. (2011). Production of multifunctional lipases by Penicillium verrucosum and Penicillium brevicompactum under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. Bioprocess and biosystems engineering, 34(2), 145-152.

Soares, D., Pinto, A. F., Gonçalves, A. G., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2013). Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. Biochemical engineering journal, 81, 15-23.

Soares, D., da Silva Serres, J. D., Corazza, M. L., Mitchell, D. A., Gonçalves, A. G., & Krieger, N. (2015). Analysis of multiphasic behavior during the ethyl esterification of fatty acids catalyzed by a fermented solid with lipolytic activity in a packed-bed bioreactor in a closed-loop batch system. Fuel, 159, 364-372.

Soccol, C. R., & Vandenberghe, L. P. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, 13(2), 205-218.

Thakur, S. (2012). Lipases, its sources, properties and applications: a Review. Int J Sci Eng Res, 3, 1-29.

Tran, D. T., Chen, C. L., & Chang, J. S. (2016). Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized Burkholderia lipase in a packed-bed bioreactor. Applied Energy, 168, 340-350.

Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). Int Res J Biol Sci, 1(8), 88-92.

Yu, X. W., Sha, C., Guo, Y. L., Xiao, R., & Xu, Y. (2013). High-level expression and characterization of a chimeric lipase from Rhizopus oryzae for biodiesel production. Biotechnology for biofuels, 6(1), 1.